

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares



**Puesta a punto de un algoritmo molecular diagnóstico en
pacientes con ELA y/o DFT**

Daniel Borrego Hernández

Madrid, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias. Departamento de Biología Molecular



**Puesta a punto de un algoritmo molecular diagnóstico en
pacientes con ELA y/o DFT**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por:
Daniel Borrego Hernández

Graduado en Biología,
para optar al grado de Doctor por la
Universidad Autónoma de Madrid

Director de Tesis:
Dr. D. Alberto García Redondo

Laboratorio de Investigación en ELA – Instituto de Investigación Hospital 12
de Octubre

Madrid, 2019

Certificado del director

Madrid, 20 de septiembre de 2019

Don Alberto García Redondo, Doctor en Ciencias por la UAM, profesor asociado del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la UCM (sección farmacia) y Director del Laboratorio de Investigación en ELA en el Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital 12 de Octubre “i+12”, como Director de Tesis,

CERTIFICA:

Que Don Daniel Borrego Hernández, con DNI 70077421-D, graduado en Biología, ha realizado bajo mi dirección en el Laboratorio de Investigación en ELA del Instituto de Investigación i+12 de Madrid, el trabajo titulado:

PUESTA A PUNTO DE UN ALGORITMO MOLECULAR DIAGNÓSTICO EN PACIENTES CON ELA Y/O DFT

Una vez supervisado el trabajo, considero que cumple con éxito todos los requisitos necesarios en cuanto a originalidad y calidad para ser presentado como Tesis Doctoral con el objeto de optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, a 20 de septiembre de 2019

Fdo: Alberto García Redondo

Esta tesis doctoral ha sido realizada inicialmente gracias a la concesión de una ayuda del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12) para la incorporación de Becarios a Proyectos de Investigación; también a las Ayudas para la Contratación de Investigadores Predoctorales cofinanciadas por el Fondo Social Europeo (Programa Operativo de Empleo Juvenil e Iniciativa de Empleo Juvenil de la Consejería de Educación e Investigación de la Comunidad de Madrid); así como a las subvenciones concedidas al Dr. Alberto García Redondo como IP por el ISCIII, para el desarrollo de los proyectos PI14/00088 y PI17/00491.

Hoy día todo el mundo es feliz... Pero, ¿no te gustaría tener la libertad de ser feliz (...) de otra manera? A tu modo, por ejemplo; no a la manera de todos.

Un mundo feliz (Aldous Huxley)

AGRADECIMIENTOS

“Cualquier destino, por largo y complicado que sea, consta en realidad de un solo momento: el momento en el que el hombre sabe para siempre quién es”.

El Aleph (Jorge Luis Borges)

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo y ánimo de muchas personas de mi entorno. Tampoco hubiera sido posible sin la ayuda de muchos compañeros en la adquisición de nuevos conocimientos a lo largo de todo este trayecto. GRACIAS A TODOS.

Gracias a mi director de tesis, el Dr. Alberto García Redondo, que me dio una gran oportunidad cuando se acercaba el precipicio del final del Máster, justo en el momento que es más difícil encontrar la oportunidad que te permita avanzar para lo que te has estado preparando muchos años. Y, principalmente, gracias por el último año de tesis, por hacerme sentir importante en el pedazo de equipo que hemos formado con Gabri y Adri. Hemos conseguido crecer en conjunto a pesar de que también haya habido momentos complicados.

Gracias al Dr. Miguel Ángel Martín Casanueva, director del grupo de Enfermedades Raras, Mitocondriales y Neuromusculares y al Dr. Joaquín Arenas Barbero, director del Instituto de Investigación Biomédica i+12, por su cercanía y por su ayuda para permitirme formar parte de este Instituto.

Gracias al Dr. Jesús Esteban Pérez, nuestro neurólogo y director de la Unidad de ELA, que siempre ha demostrado un gran interés por el campo de la genética. Siempre es un placer escucharte y aprender sobre los diagnósticos clínicos.

Gracias al Dr. Alberto Villarejo Galende, y a su equipo, que han permitido realizar el estudio en pacientes con DFT y han mostrado una predisposición y profesionalidad enorme a la hora de comentar resultados e implicarse en todo lo relativo a la investigación.

Gracias a Mari Carmen, Begoña y Pilar, las enfermeras encargadas de extraer las muestras necesarias de los pacientes a lo largo de estos más de 4 años.

Gracias a la Dra. María Morán, al Dr. Francisco Martínez Azorín y a la Dra. Cristina Ugalde que siempre han tenido palabras de apoyo y risas conmigo.

Gracias a las compañeras que me acogieron y enseñaron en mis primeras andaduras en este laboratorio y cómo funciona el mundo de la ciencia, Xandra y Gabriela.

Gracias a Rafa por todas las risas, chistes e ironías que siempre aportó al laboratorio durante los primeros años. Siempre que pase por Córdoba me acordaré de Espejo y de los olivos; y siempre que vea ciclismo me acordaré de ti.

Gracias a los “viejóvenes” Patri, Vero, Teresa, Miguel, Ana, Javi, Rocío, Elena y Guille por los buenos momentos en los pasillos y en las cenas fuera del trabajo.

Gracias a Irene y Chelo por su grandísima ayuda durante mis primeros contactos con las NGS y esencialmente por su sincera amistad desde el primer año hasta el último.

Gracias a los mitocondriales Adrián, Pablo y Alberto Blázquez por estar siempre tan dispuesto a ayudarme cuando hizo falta y siempre hacerlo con toda la predisposición necesaria.

Gracias a las “Infecciosas” Paula, Inés y Samanta por una de las mejores épocas en estos años, de muchas risas y quedadas como aquel pedazo de finde en casa de Cuco.

Gracias a Charo, Pilar y Sara. A Charo y Pilar por sus reiterativas quejas sobre el uso de la centrífuga y a Sara por no tener esas quejas... Las tres sois el alma del Laboratorio de Mitocondriales.

Gracias a Sandra y a David del Laboratorio de Cáncer Hereditario, por su apoyo con la bioinformática con los paneles génicos. Y por supuesto, a Iciar por su ayuda siempre que hizo falta.

Gracias a Vicky por sacarme mil y una sonrisas tantas mañanas, eres la mayor sonrisa de todo el hospital. Gran equipo el que habéis formado tú y Paqui, sois unas tías únicas, simpáticas, agradables, personas como vosotras son las más necesarias en los trabajos.

Gracias a Viky, Marta y Mari Carmen del Grupo de IPS por su apoyo con los cultivos de fibroblastos, pero más aún por los momentos tan necesarios de risas cortando trajes por las mañanas, grandes momentos a lo Lorenzo Caprile... y las fiestecillas de cumpleaños para coger fuerzas y hacernos regalitos IPSeros.

Gracias a la Dra. Esther Gallardo porque desde el primer día que llegó nos lo pasamos genial y siempre tuvo buenas palabras, ánimos, y mucha confianza en mí. Firmado, tu Soler.

Gracias a Jorge, “bioinformático de todos”, por su grandísima ayuda con el tratamiento de datos de los exomas de los tejidos (qué difícil ha sido...). Eres un grande, porque a pesar de todos los problemas, siempre hemos terminado riéndonos y sacando adelante el trabajo. El gallego más sonriente del mundo.

Gracias al pepino (SuperAli) y al nene (SuperFer) por ser tal y cómo son, el buen rollo que generan, la ayuda que nos dan para todo, los consejos médicos, y sobre todo por las buenas risas que nos damos siempre que podemos. Ali no te vayas, qué vamos a hacer sin nuestro pepino!!!

Gracias a muchos de nuestros chicos de prácticas, TFG y TFM que he tenido el placer de conocer (Sandra, Andrea, María, Naiara, Clara, Carlos, Pablo, Irene, Paloma,...). Y en especial a Adri (Cuco) y Cris (Chi), que han sido mis dos debilidades, dos personas con un corazón enorme además de ser unos grandísimos trabajadores, que han pasado a ser unos buenos amigos. Pase el tiempo que pase, cada vez que nos veamos seguiremos como si fuera ayer.

Gracias a Gabri (Ge) y Adri (Bro) que han sido mis compañeros la mayor parte de esta larga andadura, que han hecho que el ánimo no decayera en algunos momentos, que me han dado su apoyo y han intentado sacarme una sonrisa en los momentos más desquiciantes. En especial a Gabri por nuestras “cositas” en la cafetería y a Adri por todas esas risas contagiosas a primera hora de la mañana. Sin vosotros, SEGURO que no hubiera sido posible esta tesis. Porque un laboratorio no depende de una persona, pero sí de hacer pequeñas cosas por tus compañeros sin necesidad de tener que pedirlo y de dar la cara por ellos. Será difícil sentirse tan bien en cualquier otro laboratorio.

Gracias a mi DSBJ: Alberto, Álex, Ana, Antonio, Ayuso, Elisa, Guille, Jesús, Laura, Lucía, Mario, Paola, Valera y Viro; porque cuando no ha sido uno ha sido otro el que me ha preguntado por el trabajo, por cómo iba todo, y que además me han aportado muchas de las risas, distracciones, puentes, vacaciones... tan necesarias durante estos años. Y en especial a mi grandísimo Álex por su genial diseño de portada, y por su visita el día 12-09-2019... tan necesaria... Le quiero más que Ironman a su hija (3001).

Gracias a Mariano, mi mejor amigo en la carrera, mi futuro médico de referencia... siempre dispuesto a ayudarme con cualquier cosa como la impresión de la tesis. No nos vemos todo lo que quisiéramos, pero no hace falta para sentirse a gusto con una persona como él.

Gracias a toda mi familia, por su apoyo, ánimo y confianza en mí durante el desarrollo de este doctorado. En especial a mi hermana Tamara, mi tía Yolanda y mi prima Marta, que han tenido siempre confianza ciega en que lo sacaría adelante a pesar de todas las dificultades. Gracias a mi abuela Manola, por la que sin su ayuda no hubiera tenido la oportunidad de realizar el Máster por el cual pude conocer al Dr. Alberto García Redondo, ahí empezó realmente la tesis.

Gracias a Lorena, por ser paciente y comprensiva en los momentos críticos de esta tesis. Porque ha entendido el momento en el que me encontraba y me ha brindado todo su apoyo incondicional en las buenas pero sobretodo en las malas rachas, que es lo que marca la diferencia entre cualquier persona y una persona especial. Por darme siempre su opinión objetiva sobre todo lo relacionado con esta tesis y mi trabajo en el laboratorio. Mil gracias. Y también gracias a su familia que son unos soletes, aunque ella diga que no les ponga porque parece de mentira, ellos saben lo bien que me han hecho sentir desde el principio y lo bien que me han acogido.

Gracias a mis peques Katy y Tina, que son lo más bonito del mundo, que nos dan todo su amorcito todos los días. Ojalá estuvieran para siempre.

Gracias a mis padres, sin los cuales probablemente no hubiera tenido la oportunidad de alcanzar el graduado, el máster y ahora este doctorado. Han estado en todos los momentos de dudas, de abandono y de desesperación, siempre con la cabeza fría para darme ese ánimo necesario para ver las cosas con otra mirada. Es curioso como en los momentos más difíciles es cuando más me han apoyado, y en los fáciles como si nada... son un poco raritos, pero no se les puede querer más. Siempre

recuerdo que en 2º de la ESO por motivos ajenos, suspendí 3 asignaturas y me dijeron: “no te vamos a castigar, tú sabes lo que tienes que hacer”. Siempre han confiado en mi capacidad de trabajo, en mi responsabilidad y en mi esfuerzo continuo por mejorar y mejorar, por hacer mejor las cosas. **¿Será cosa de genética?** Seguro que sí.

The background features a complex, glowing network of lines and nodes, resembling a neural network or a web of connections. The lines are primarily blue and yellow, with some nodes appearing as bright, star-like shapes. The overall effect is a sense of dynamic energy and interconnectedness.

Resumen

El diagnóstico genético de la esclerosis lateral amiotrófica y la demencia frontotemporal han quedado ligados a partir de dos principales eventos. En 2006, se identificó TDP-43 como el componente principal de las inclusiones citoplasmáticas ubiquitinadas en la ELA y como la característica neuropatológica más importante de la enfermedad (Neumann *et al.*, 2006); y en 2011, el descubrimiento de la expansión de la repetición GGGGCC en el intrón 1 de *C9orf72* en pacientes con ELA y en pacientes con DFT (Alan E Renton *et al.*, 2011; Dejesus-Hernandez *et al.*, 2011).

Desde entonces, la unión clínica, neuropatológica y genética se ha ido estrechando hasta el punto de considerarse un espectro sindrómico (Robberecht and Philips, 2013). Al menos en algunos casos, la ELA y la DFT son diferentes manifestaciones del mismo proceso patológico subyacente, por lo que hay individuos con ELA, otros con DFT y otros con ambas patologías tanto en casos aislados como en linajes con varios miembros (Mackenzie, Rademakers and Neumann, 2010). El cambio en el escenario del diagnóstico molecular gracias a la inclusión de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva han provocado un enorme aumento de conocimiento en la genética de ambas patologías (Marangi and Bryan J Traynor, 2015; Lamp *et al.*, 2018a) provocando a su vez una mayor dificultad en el procesamiento de los datos y especialmente en la interpretación de los resultados, haciendo más necesario el asesoramiento al paciente a través de la formación de equipos especializados en consejo genético.

Uno de los objetivos más ambiciosos de este trabajo es intentar demostrar la existencia de un origen somático a través de la secuenciación del exoma completo. Además, a través de la utilización de distintas técnicas de secuenciación, se intenta analizar la oligogenia y la eficiencia de la *NGS* para el diagnóstico molecular y su utilización como herramienta rutinaria. También, gracias a la *NGS* se busca encontrar el mejor algoritmo diagnóstico molecular que permita realizar un óptimo análisis genético a todos los pacientes con ELA y DFT. A su vez, con el fin de encontrar posibles factores de riesgo de estas patologías se han analizado las longitudes intermedias de la expansión causante de la enfermedad de Kennedy.

Nuestros resultados no encuentran diferencias en la presencia de variantes puntuales ni de pequeñas deleciones en los genes asociados al espectro ELA-DFT ni tampoco la presencia o acumulación de variantes raras ($MAF < 0,01$) puntuales en la parte codificante del genoma en diferentes tejidos de pacientes con ELA para el hallazgo de mutaciones de origen somático. Los resultados de esta tesis apoyan la necesidad de incluir *WES* en el diagnóstico genético de los casos ELAf y DFTf, e incluye el grupo de comorbilidad de ambas patologías (ELA-DFT) independientemente de la existencia de antecedentes familiares. La presencia de la oligogenia es un proceso más frecuente de lo esperado en la población española, teniendo especial relevancia los factores de riesgo en genes ampliamente conocidos. De igual manera, se establece un algoritmo molecular diagnóstico que incluye las prioridades en el análisis genético ante la llegada de nuevos pacientes, así como las técnicas necesarias para llevar a cabo un diagnóstico costo-eficiente.



Summary

Amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia molecular diagnosis have been joined since two main discoveries. In 2006, TDP-43 was identified as the major component of ubiquitinated cytoplasmic inclusions in ALS and as the most important neuropathological hallmark of the disease (Neumann *et al.*, 2006); and the linkage of the repeat expansion in intron 1 of *C9orf72* in ALS and FTD patients in 2011 (Alan E Renton *et al.*, 2011; Dejesus-Hernandez *et al.*, 2011).

Since then, clinical, neuropathological and genetic junction has been narrowed to the point of being considered a continuum spectrum (Robberecht and Philips, 2013). ALS and FTD are different manifestations of the same underlying pathological process at least in some cases, so there are ALS and FTD patients, and others with both pathologies in sporadic cases and in different members of a kindred (Mackenzie, Rademakers and Neumann, 2010). The changing scene in molecular diagnosis thanks to the arrival of NGS has caused an enormous increase in genetics knowledge in both pathologies (Marangi and Bryan J Traynor, 2015; Lamp *et al.*, 2018a) causing greater awkwardness in data processing and especially in results' interpretation, making the formation of specialized teams in genetic counseling more necessary.

One of the most ambitious aims of this thesis is to attempt to demonstrate the existence of a somatic origin through WES. In addition, through the use of different sequencing techniques, we try to analyze the oligogenic inheritance and NGS efficiency for molecular diagnosis and its use as a routine tool. As well, thanks to NGS, we look for the best molecular diagnostic algorithm enabling an optimal genetic analysis to be performed on ALS and FTD patients worldwide. Moreover, in order to find possible risk factors, the intermediate lengths of the expansion causing Kennedy's disease have been analyzed.

Our results do not find differences in the presence of specific variants or small deletions in genes previously associated with the FTD-ALS spectrum, nor the presence or accumulation of rare variants ($MAF < 0.01$) in exome in different tissues of ALS patients to find somatic mutations. The results of this thesis support the need to develop WES in the genetic diagnosis of familial ALS and FTD cases, and includes the FTD-ALS comorbidity group regardless the existence of familial history. Oligogenic inheritance is a more usual process than expected in the Spanish population, with risk factors in widely known genes having special relevance. Similarly, a molecular diagnostic algorithm is established including main priorities in genetic analysis before new patients arrival, as well as the necessary techniques to carry out the most cost-efficient diagnosis.



Índice

Abreviaturas	1
Introducción.....	5
1. ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA.....	7
1.1 Definición de ELA	7
1.2 Sistemas de clasificación de la ELA	7
1.3 Criterios de El Escorial, El Escorial Revisados y Awaji-Shima	9
1.4 La ELA es una enfermedad rara.....	9
1.5 Descubrimiento de la expansión de la repetición GGGGCC en el intrón 1 de <i>C9orf72</i>	10
1.6 Genética de la ELA	11
1.6.1 SOD1	11
1.6.2 TARDBP	12
1.6.3 FUS.....	12
1.6.4 Otros genes.....	13
1.7 Neuropatología de la ELA.....	16
2. DEMENCIA FRONTOTEMPORAL.....	17
2.1 Definición de DFT.....	17
2.2 Sistemas de clasificación de la DFT.....	17
2.3 Genética de la DFT.....	18
2.4 Neuropatología de la DFT	19
3. ESPECTRO CONTINUO ELA-DFT	21
3.1 Clínica	21
3.2 TDP-43	21
3.3 Genética en el continuo ELA-DFT	21
4. EL CAMBIO DE ESCENARIO EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR	23
5. OLIGOGENIA	24
6. PLEIOTROPÍA.....	25
7. FACTORES DE RIESGO DE ELA Y DFT	25
Objetivos.....	27
Material y métodos.....	31

1. PACIENTES	33
1.1 Procedencia de las muestras	33
1.2 Clasificación de los pacientes.....	33
1.3 Características de los pacientes	34
2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DEL ADN.....	36
2.1 Extracción de ADN de sangre	36
2.2 Extracción de ADN de tejido congelado	36
3. MÉTODOS DE SECUENCIACIÓN	36
3.1 Secuenciación Sanger.....	36
3.2 Estudio de la expansión de la repetición en el intrón 1 de C9orf72	38
3.3 Estudio de la expansión de la repetición en ATXN2	41
3.4 Panel génico personalizado	43
3.5 Secuenciación del exoma completo (WES)	45
3.5 Demostración del posible origen somático de la ELA	47
4. CLASIFICACIÓN DE VARIANTES	51
Resultados	53
1. VALORACIÓN DE LA EXPANSIÓN DE LA REPETICIÓN DE TRINUCLEÓTIDOS EN EL GEN AR COMO FACTOR DE RIESGO DE ELA Y/O DFT	55
2. DEMOSTRACIÓN DEL POSIBLE ORIGEN SOMÁTICO DE LA ELA	55
3. PUESTA A PUNTO DE DIFERENTES APROXIMACIONES DE SECUENCIACIÓN MASIVA COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA	57
3.1 Panel génico personalizado	57
3.2 WES	61
3.3 Panel génico VS WES.....	65
4. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN ESPAÑOLA CON ELA Y/O DFT.....	66
5. ANÁLISIS DE LA OLIGOGENIA	73
6. DISEÑO DE UN ALGORITMO MOLECULAR DIAGNÓSTICO EN PACIENTES CON ELA Y/O DFT.....	75
Discusión.....	79

1. VALORACIÓN DE LA EXPANSIÓN DE LA REPETICIÓN DE TRINUCLEÓTIDOS EN EL GEN AR COMO FACTOR DE RIESGO DE ELA Y/O DFT	81
2. DEMOSTRACIÓN DEL POSIBLE ORIGEN SOMÁTICO DE LA ELA	82
3. PUESTA A PUNTO DE DIFERENTES APROXIMACIONES DE SECUENCIACIÓN MASIVA COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA	83
4. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN ESPAÑOLA CON ELA Y/O DFT	85
4.1 <i>C9orf72</i>	85
4.2 <i>SOD1</i>	85
4.3 <i>TARDBP</i>	88
4.4 <i>SQSTM1</i>	88
4.5 <i>Otros genes</i>	89
5. ANÁLISIS DE LA OLIGOGENIA	92
6. DISEÑO DE UN ALGORITMO MOLECULAR DIAGNÓSTICO EN PACIENTES CON ELA Y/O DFT.....	94
Conclusiones.....	97
Bibliografía.....	101
Anexos.....	127

The background of the slide is an abstract, ethereal composition of glowing, fiber-like structures. These structures, which resemble neurons or optical fibers, are primarily blue and white, with some transitioning into warm yellow and orange hues. They are set against a dark, gradient background, creating a sense of depth and complexity. The overall effect is one of a dynamic, interconnected network.

Abreviaturas

a-DLFT-U	DLFT atípico con inclusiones positivos para ubiquitina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AME	Atrofia muscular espinal
AMEB	Atrofia muscular espinobulbar
AMP	Atrofia muscular progresiva
APNF	Afasia progresiva no fluente
APP	Afasia primaria progresiva
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CEE	Criterios de El Escorial
CEER	Criterios de El Escorial Revisados
CIBERNED	Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas
CMT	Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth
CMT2	Charcot-Marie-Tooth tipo 2
CMT4J	Charcot-Marie-Tooth tipo 4J
CNV	Variación en número de copias
Cu/Zn	Cobre/Zinc
DCB	Degeneración corticobasal
DFT	Demencia frontotemporal
DFTe	DFT esporádica
DFT-ELA	Paciente con DFT que desarrolla ELA
DFT-ENM	Concomitancia DFT y ENM
DFTf	DFT familiar
DFTvc	DFT variante conductual
DLFT	Degeneración lobular frontotemporal
DLFT-FET	DLFT con inclusiones positivas para proteínas de la familia FET
DLFT-FUS	DLFT con inclusiones positivas para FUS
DLFT-tau	DLFT con inclusiones positivas para tau
DLFT-TDP	DLFT con inclusiones positivas para TDP-43
DLFT-U	DLFT con inclusiones positivas para ubiquitina
DLFT-UPS	DLFT con inclusiones positivas para p62
DNs	Neuritis distróficas
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DS	Demencia semántica
EA	Enfermedad de Alzheimer
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
ELA-DFT	Paciente con ELA que desarrolla DFT
ELAe	ELA esporádica
ELAf	ELA familiar
ELA-FUS	ELA con inclusiones positivas para FUS
ELA-SOD1	ELA con inclusiones positivas para SOD1
ELA-TDP	ELA con inclusiones positivas para TDP-43
ELP	Esclerosis lateral primaria
EMG	Electromiografía (y palabras derivadas)
ENM	Enfermedad de neurona motora

EP	Enfermedad de Parkinson	
ER	Expansión de la repetición	
EWS	Proteínas de unión a ARN Sarcoma de Ewing	
FDA	U.S. Food and Drug Administration	
FEDER	Federación Española de Enfermedades Raras	
GWAS	Genome Wide-Association Study	
H₂O_d	Agua desionizada	
HC	Hemisferio cerebeloso	
HFP	Historia familiar positiva	
HSP	Paraparesia espástica hereditaria	Hereditary Spastic Paraplegia
EH	Enfermedad de Huntington	
MCI	Miopatía por cuerpos de inclusión	
ME	Médula espinal	
MgCl₂	Cloruro de magnesio	
NCBI	National Center for Biotechnology Information	
NCIs	Inclusiones citoplasmáticas neuronales	
NGS	Secuenciación de última generación	Next Generation Sequencing
NIIs	Inclusiones intranucleares neuronales	
NLS	Señal de localización nuclear	Nuclear Localization Sequence
NMI	Neurona motora inferior	
NMS	Neurona motora superior	
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man	
pb	Pares de bases	
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	
POAG	Glaucoma primario de ángulo abierto	Primary Open-Angle Glaucoma
PSP	Parálisis supranuclear progresiva	
SCA2	Ataxia espinocerebelosa 2	Spinobulbar cerebellar ataxia
SNC	Sistema nervioso central	
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido	Single Nucleotide Polimorphism
TAE	Tris-acetato EDTA	
TAF15	Factor 15 asociado a la proteína TATA	
TaqPol	Polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>	
TDP-43	Proteína TAR de unión a ADN de 43 kDA	
TE	Tris-EDTA	
TRN1	Transportina 1	
UV	Ultravioleta	
VUS	Variante de significado incierto	Variant of Uncertain Significance
WES	Secuenciación del exoma completo	Whole Exome Sequencing
WFN	Federación Mundial de Neurología	World Federation of Neurology
WGS	Secuenciación del genoma completo	Whole Genome Sequencing

The background of the slide is an abstract, ethereal composition of glowing, fiber-like structures. These structures, which resemble neurons or optical fibers, are primarily blue and white, with some transitioning into warm yellow and orange hues. They are set against a dark, gradient background, creating a sense of depth and complexity. The overall effect is one of a dynamic, interconnected network.

Introducción

1. ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

1.1 Definición de ELA

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA; OMIM: 105400) es una enfermedad neurodegenerativa que representa el 90-95% de las enfermedades de la neurona motora (ENM) del adulto y está caracterizada por la degeneración progresiva tanto de las neuronas motoras superiores (NMS) como de las inferiores (NMI) (Sejvar *et al.*, 2005; Robberecht and Philips, 2013). Los pacientes experimentan signos y síntomas de atrofia muscular progresiva y debilidad, incremento en la fatiga, y problemas para tragar, que normalmente conducen al fallo respiratorio y a la muerte (Sejvar *et al.*, 2005; Al-Chalabi *et al.*, 2012). Es un continuo progreso de déficits funcionales que llevan a la pérdida completa de independencia (Ng, Talman and Khan, 2011).

Se considera como edad de inicio más común entre los 50 y 65 años, disminuyendo en edades posteriores (O'Toole *et al.*, 2008; Joensen, 2012). La supervivencia media es de 2 a 5 años desde el inicio de síntomas (del Aguila *et al.*, 2003; Chiò *et al.*, 2009), y únicamente entre el 5-10% de los pacientes sobreviven más de 10 años (Chiò *et al.*, 2009). No hay curas efectivas para la ELA, aunque el *Benzotiazol riluzol* ralentiza la tasa de progresión de la enfermedad y prolonga la supervivencia durante 3 meses más (Bensimon *et al.*, 1994; Lacomblez *et al.*, 1996; Riviere *et al.*, 1998; Renton, Chiò and Traynor, 2014). En el año 2017, la FDA también aprobó el *edaravone* para el tratamiento de la ELA, pero este medicamento parece tener un efecto modificador de la enfermedad solo en un subgrupo de pacientes y su influencia en la supervivencia aún se está estudiando (Al-Chalabi *et al.*, 2017). La terapia génica como forma de medicina personalizada es muy prometedora y ya se han completado los ensayos clínicos en etapa temprana que incluyen oligonucleótidos antisentido contra *SOD1* mutado (Miller *et al.*, 2013) y también se ha propuesto una terapia similar para la expansión de la repetición *C9orf72* (Fernandes *et al.*, 2013). El problema de estas medicinas personalizadas es el poco alcance de estos ensayos clínicos, pues se realizan en pocos centros y están dirigidos a mutaciones muy concretas dentro del gen, que afectan a un porcentaje muy bajo de pacientes, en torno al 5%.

1.2 Sistemas de clasificación de la ELA

Hay varios sistemas de clasificación establecidos para la ELA. Una clasificación se refiere a la **forma de inicio anatómica** de la enfermedad, distinguiendo la ELA bulbar de la ELA espinal, que depende del grupo muscular afectado tras la aparición de los primeros síntomas, si son inervados por segundas neuronas motoras que realizan su sinapsis a través de la zona del mesencéfalo (bulbo raquídeo), hacia los músculos de la garganta y boca, o desde la médula espinal, hacia los músculos de las extremidades, respectivamente.

Otra posible clasificación se relaciona con la **participación de la neurona motora superior o inferior** al inicio de la enfermedad, y con el grado de asimetría.

Por consiguiente, la clasificación más ampliamente utilizada consiste en definir un inicio de la enfermedad de neurona motora bulbar o espinal, y luego categorizar como atrofia muscular progresiva (AMP), que es un fenotipo asimétrico de NMI, como esclerosis lateral primaria (ELP), que es un fenotipo a menudo simétrico de NMS, o como ELA, la cual puede ser individualizada por el sistema de clasificación definido en El Escorial en 1989 por la WFN (World Federation of Neurology) como definida, probable o posible según el número de regiones anatómicas afectadas tanto por NMS como NMI.

Otra clasificación muy común en estudios de ELA es la distinción entre pacientes de ELA con **historia familiar** y pacientes de ELA sin antecedentes familiares. Entre el 5-10% de los casos de ELA son considerados de naturaleza familiar (ELAf), mientras que el 90% restante de los casos son clasificados como esporádicos (ELAe), es decir, como resultado de la aparición de la enfermedad en personas sin antecedentes familiares aparentes (Chiò *et al.*, 2009; Wijesekera and Leigh, 2009). En estudios más recientes como el de Byrne *et al.* (2010), se comprobó que la proporción de ELA que es familiar es aproximadamente el 5% si se tienen en cuenta parientes de primer grado, pero este porcentaje aumenta si se incluyen familiares más distantes y la demencia frontotemporal (DFT) (Vajda *et al.*, 2017). Aun así, aunque resulta útil para el diseño de estudios genéticos, hay que tener presente que esta clasificación es artificial puesto que los factores genéticos juegan un papel importante en ambos tipos.

Los límites de una historia familiar también pueden ser ampliados significativamente con la inclusión de enfermedades relacionadas (incluyendo autismo, esquizofrenia, enfermedad bipolar, esclerosis múltiple y enfermedad de Parkinson (EP) (Byrne *et al.*, 2013). Otro de los problemas es realizar una historia familiar fiable en trastornos cognitivos, específicamente diferenciar enfermedad de Alzheimer (EA) de DFT en familiares basándose solo en la historia clínica. Toda falta de información junto con los diferentes criterios a la hora de analizar una genealogía genera un riesgo de sobreestimar o subestimar el porcentaje de ELA con historia familiar positiva.

Por lo tanto, la distinción entre ELA familiar y ELA esporádica no está clara, y esto se ve acentuado por la observación de que cada gen que se establece en pacientes con historia familiar, también se encuentra reflejado en la población con ELA esporádica (Talbot, 2011).

Para terminar de diseccionar los factores que complican tanto la implicación de una variante en la patología como la confirmación de una posible herencia, hay que nombrar la presencia de mutaciones *de novo*, que han sido descritas en genes como *FUS* (Bäumer *et al.*, 2010) y *SOD1* (Arthur *et al.*, 2017).

1.3 Criterios de El Escorial, El Escorial Revisados y Awaji-Shima

El diagnóstico de la ELA es únicamente clínico ya que carece de biomarcadores moleculares o de imagen que lo confirmen. Ante la dificultad y el retraso en el diagnóstico clínico y para promover la investigación, en 1990 se establece por primera vez un consenso mundial promovido por la WFN en la localidad de San Lorenzo de El Escorial (Madrid) para el diagnóstico y clasificación de estos enfermos, los Criterios de El Escorial (CEE) (Brooks, 1994). Tras su aplicación inicial, en 1997 se procede a una modificación de los mismos denominándose Criterios de El Escorial Revisados (CEER) (Brooks *et al.*, 2000). Estos criterios establecen el diagnóstico de ELA por la presencia de signos clínicos de afectación de NMS, presencia de signos clínicos o electromiográficos (EMG) de NMI, progresión del cuadro, ausencia de signos de afectación de otros sistemas y ausencia de otros procesos que pudieran explicar este conjunto de hallazgos. Finalmente, los pacientes se clasifican como definida, probable, posible o sospecha, según el número de regiones anatómicas afectadas (bulbar, cervical, torácica y lumbar) por estos síntomas y signos.

Estos criterios se han llegado a considerar demasiados teóricos y restrictivos por lo que muchos pacientes mueren antes de llegar a cumplirlos (Traynor *et al.*, 2000). Por este motivo, se rehacen en 2008 con el algoritmo de Awaji-Shima (de Carvalho *et al.*, 2008) en el que se modifica el criterio EMG necesario para definir si una región está afecta de NMI, pero manteniendo los principios de los CEER. La principales diferencias son que los hallazgos EMG pasan de tener una consideración secundaria a tener una tan importante como el examen físico; y que la presencia de fasciculaciones en el EMG se equiparan a la presencia de fibrilaciones (denervación muscular activa) en el contexto de un músculo con signos de reinervación crónica.

1.4 La ELA es una enfermedad rara

La ELA se considera una enfermedad perteneciente al grupo de las **enfermedades raras**. Para que una enfermedad específica pueda ser considerada rara tiene que afectar a menos de 5 por cada 10.000 habitantes (FEDER). Se estima que en Europa, la tasa de incidencia media de la ELA es de 2-3/100.000 habitantes, que se corresponden con la estimación de unos 15.000 casos nuevos anualmente. Y la prevalencia media es de 4-7/100.000 habitantes, o lo que es lo mismo, hay unos 40.000 casos prevalentes (Logroscino *et al.*, 2011; Joensen, 2012; Chiò *et al.*, 2013). Por lo tanto, la ELA no es tan “rara” como uno podría pensar en principio, sino que al tener una mortalidad continua y rápida, la prevalencia no se eleva muy por encima del límite de 5 afectados por cada 100.000 habitantes.

La mayoría de los estudios muestran un incremento de la incidencia con la edad. Algunos investigadores sugieren que el envejecimiento de la población mundial contribuye a detectar mayor número de casos de ELA (Govoni *et al.*, 2003; Cima *et al.*, 2009). La mayoría de los estudios reportan

un pico en la tasa de incidencia de la ELA entre las edades de 55 y 65 años (Chancellor and Warlow, 1992; Fang *et al.*, 2009).

Entre los estudios europeos, parece haber una tendencia a que la tasa de incidencia de la ELA aumenta en países de mayor latitud: el riesgo de ELA es mayor en Escandinavia y sigue un gradiente norte-sur (Majounie *et al.*, 2012; Mok, Traynor, *et al.*, 2012). Además, en poblaciones genéticamente homogéneas y aisladas, como en Finlandia (Laaksovirta *et al.*, 2010) y en Cerdeña (Chiò, Borghero, *et al.*, 2011), la genética juega un papel mayor en el desarrollo de la ELA.

1.5 Descubrimiento de la expansión de la repetición GGGGCC en el intrón 1 de *C9orf72*

En 2011, la realización de un GWAS de pacientes fineses con ELA identificó un *locus* en el cromosoma 9p21, que estaba presente en más del 40% de los casos de ELA familiar y en aproximadamente el 25% de todos los casos de ELA (Van Es *et al.*, 2009; Laaksovirta *et al.*, 2010). Estudios posteriores identificaron el haplotipo finés en otras poblaciones europeas (Shatunov *et al.*, 2010; Morgan *et al.*, 2017) y determinaron que surgió de una sola mutación fundadora (Laaksovirta *et al.*, 2010). La causa del resultado del GWAS fue identificada como una expansión de una repetición (ER) de hexanucleótidos localizada entre los primeros exones no codificantes que sufren alternativamente un *splicing* (denominados 1a y 1b) (Alan E Renton *et al.*, 2011; DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011). Si el exón 1a está incluido, la repetición del hexanucleótido se transcribe (transcrito tipo 1, NM_145005.5 y transcrito tipo 3, NM_001256054.1), mientras que si el exón 1b es el que está incluido, la repetición se ubica en la región promotora (transcrito tipo 2, NM_018325.3).

En estudios posteriores, la frecuencia de la expansión fue evaluada en 17 regiones alrededor del mundo, incluyendo países europeos, diferentes poblaciones étnicas en Estados Unidos, en países asiáticos, Australia, en Medio Oriente y en Islas del Pacífico (Majounie *et al.*, 2012). Además, todos los pacientes con la expansión también tenían el haplotipo fundador finés rs3849942 (Mok, Traynor, *et al.*, 2012). La frecuencia más alta de la mutación es en Finlandia (21%) y sigue un gradiente de norte a sur (*Tablas 1 y 2*). Se estimó que la mutación ocurrió aproximadamente hace 1500 años, unas 100 generaciones en Finlandia, 80 en Alemania y 60 en Italia (Majounie *et al.*, 2012).

El número de repeticiones en los individuos sanos suele ser de 2 a 10, habiéndose descrito expansiones de hasta 23 repeticiones en controles sanos mientras que los pacientes con ELA o DFT asociados a esta variante tienen entre 30 y varios cientos de repeticiones (Alan E Renton *et al.*, 2011; DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011). Sin embargo, se ha identificado un número de repeticiones intermedias, de 20 a 30, tanto en pacientes como en controles (Byrne *et al.*, 2014; Rohrer *et al.*, 2015) de difícil caracterización sobre todo de cara al consejo genético.

Otros análisis realizados en pacientes de ELA y de DFT (esporádicos y familiares) utilizando la técnica de la triple PCR, demostraron que esta ER de hexanucleótidos es la causa más frecuente de

ELA y DFT (Gijssels *et al.*, 2012; Mahoney *et al.*, 2012; Mok *et al.*, 2012; García-Redondo *et al.*, 2013; Jang *et al.*, 2013).

País	Finlandia	Reino Unido	Irlanda	Holanda	Alemania	Francia	Italia	España	Grecia
ELAf	46	46	41	47	22	46	38	27	50
ELAe	21	7	5	5	5	8	4	3	8

Tabla 1. Gradiente norte-sur C9orf72 en ELA. Porcentaje de casos causados por la expansión de C9orf72 en ELAf y ELAe en distintos países de Europa. Datos extraídos de (Majounie *et al.*, 2012).

País	Finlandia	Suecia	Reino Unido	Holanda	Bélgica	Alemania	Francia	Italia	España
DFTf	48	57	17	26	17	10	44	6	30
DFTe	19	12	6	2	4	4	10	6	3

Tabla 2. Gradiente norte-sur C9orf72 en DFT. Porcentaje de casos causados por la expansión de C9orf72 en DFTf y DFTe en distintos países de Europa. Datos extraídos de (van der Zee *et al.*, 2013).

El fenotipo clínico asociado con estas expansiones se caracteriza principalmente por síntomas de DFT y signos de enfermedad de las neuronas motoras. La presentación clínica también se extiende a casos con rasgos de EA, cuerpos de Lewy diagnosticados inicialmente como EA o demencia con cuerpos de Lewy, e incluso se ha descrito en una fenocopia de la enfermedad de Huntington (Murray *et al.*, 2011; Hensman *et al.*, 2014).

1.6 Genética de la ELA

1.6.1 SOD1

El primer gen identificado en ELA familiar fue *SOD1*. Inicialmente se descubrió un ligamiento genético en el cromosoma 21q22.1 se describió inicialmente en 1991 (Siddique *et al.*, 1991). Dos años más tarde, un consorcio internacional identificó a *SOD1* como un gen responsable de los casos de ELAf autosómicos dominantes, mediante el análisis de ligamiento en 18 pedigrís de ELA, que describió once mutaciones asociadas a la enfermedad (Rosen *et al.*, 1993). El gen *SOD1* codifica por la superóxido dismutasa de Cu/Zn, una enzima citoplásmica cuya función es la transformación de los radicales superóxido (McCord JM and Fridovich I, 1969).

A día de hoy se han descrito más de 180 mutaciones en este gen (Abel *et al.*, 2013). La mayoría de los cambios afectan a residuos de SOD1 que están altamente conservados filogenéticamente (Levanon *et al.*, 1985; Perl-Treves *et al.*, 1988; Henkle *et al.*, 1991; Bewley, 2016) lo que sugiere que esos sitios son importantes para la función de SOD1.

La mayoría de las mutaciones muestran un patrón de herencia autosómica dominante con alta penetrancia. Una excepción notable es la que representa la variante p.D90A (p.D91A en el actual sistema de numeración), la cual presenta herencia recesiva en la población escandinava pero dominante en el resto del mundo (Robberecht *et al.*, 1996; Andersen *et al.*, 1997). También se han descrito variantes, como la p.G16S, con asociación a formas juveniles (Kawamata *et al.*, 1997). La

razón de por qué una mutación en *SOD1* puede ser selectivamente dañina en neuronas motoras es aún desconocida, dado que este gen está ampliamente expresado y conservado (Crapo *et al.*, 1992).

1.6.2 *TARDBP*

En 2006, se identificó la proteína TAR de unión a ADN de 43 kDa (TDP-43) como el componente principal en las inclusiones citoplasmáticas ubiquitinadas en la ELA y como la característica neuropatológica más importante de la enfermedad (Neumann *et al.*, 2006). Tras este descubrimiento, las mutaciones en el gen *TARDBP* (que codifica para TDP-43) se relacionaron con casos de ELAf y ELAe (Gitcho *et al.*, 2008; Kabashi *et al.*, 2008; Sreedharan *et al.*, 2008). Una de las funciones principales de TDP-43 es regular el procesamiento de ARN, incluidos los que codifican para proteínas involucradas en la supervivencia neuronal (Tollervey *et al.*, 2011).

Se han descrito más de 50 mutaciones diferentes, casi todas las variantes son de cambio de aminoácido (*missense*) (Lattante, Rouleau and Kabashi, 2013) mostrando un patrón de herencia autosómico dominante como se demuestra en la gran cantidad de estudios en poblaciones de diferente origen geográfico de pacientes con ELAf (Deerlin *et al.*, 2008; Kühnlein *et al.*, 2008; Rutherford *et al.*, 2008; Corrado *et al.*, 2009).

Un caso curioso es la población de Cerdeña. Dicha población tiene una frecuencia relativamente alta de la variante p.A382T, que puede explicarse por un efecto fundador (Chiò, Borghero, *et al.*, 2011). Esta variante puede estar asociada con una enfermedad de la neurona motora principalmente inferior con un inicio asimétrico en los músculos distales de las extremidades, que luego se extiende a los músculos proximales, con una relativa conservación de los músculos bulbares (Corrado *et al.*, 2009).

1.6.3 *FUS*

Las mutaciones en *FUS* se identificaron tras un estudio de ligamiento que indicó la región genómica 16q11.2. Posteriormente, y gracias al hallazgo de *TARDBP* como causa genética de la enfermedad, se estudió *FUS* por las similitudes estructurales de las proteínas por las que codifican estos genes, describiéndose 14 mutaciones en 17 familias de origen británico y americano (Kwiatkowski *et al.*, 2009; Vance *et al.*, 2009).

En el núcleo, al igual que TDP-43, se cree que la proteína *FUS* está involucrada en la regulación de la transcripción y el *splicing* del pre-ARNm. El *FUS* citoplasmático en las neuronas parece tener un papel en el transporte de ARNm, donde potencialmente puede facilitar la síntesis de proteínas locales en la sinapsis (Colombrita *et al.*, 2012).

Se encontró que la proteína *FUS* se depositaba en inclusiones citoplásmicas en estos pacientes (Kwiatkowski *et al.*, 2009). La gran mayoría de las mutaciones son sustituciones de aminoácidos, autosómicas dominantes y se encuentran en el exón 15, que codifica el extremo C-terminal de la

proteína, y el resto son mutaciones que cambian el marco de lectura (*frameshift*) o de terminación temprana de la traducción (*nonsense*). Los últimos 18 residuos C-terminales constituyen la señal de localización nuclear (NLS) de la proteína, por lo que estas mutaciones interrumpen la unión de FUS a Transportin 1, un receptor de importación nuclear que transporta proteínas con un NLS no canónico (como el de FUS) del citoplasma al núcleo (Lee *et al.*, 2006; Zakaryan and Gehring, 2006).

Las mutaciones de novo de *FUS*, como es el caso de la p.P525L (Conte *et al.*, 2012) también son responsables de una parte de los casos esporádicos y juveniles de ELA (Bäumer *et al.*, 2010).

1.6.4 Otros genes

Desde entonces, debido a la gran mejora de las tecnologías de secuenciación, se han publicado más de 50 genes potenciales para la ELA (Taylor, Brown and Cleveland, 2016). Sin embargo, muchos de ellos siguen siendo estudios únicos no replicados, y validar la causalidad de muchas variantes específicas sigue siendo un gran reto (Lamp *et al.*, 2018b). A continuación, se realiza un repaso de los genes clásicamente relacionados con la ELA y algunos de reciente descubrimiento.

El gen *ALS2* se identificó muy pronto, pero apenas representa unos pocos casos de ELA de inicio juvenil autosómica recesiva, originalmente descrito en Túnez (Ben Hamida, Hentati and Ben Hamida, 1990; Hadano *et al.*, 2001; Eymard-Pierre *et al.*, 2002).

Aunque las mutaciones de *SETX* se asocian más típicamente con AOA2 (Chen *et al.*, 2004; Duquette *et al.*, 2005), solo se han identificado cuatro mutaciones de *SETX* en la ELA, y todas ellas son cambios aminoacídicos (Chen *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2009). En ataxia con apraxia oculomotora de tipo 2 (AOA2) se han identificado variantes en homocigosis o heterocigosis compuesta, que en su mayoría conducen a una terminación prematura de la proteína (Moreira *et al.*, 2004).

También se han notificado casos de *ANG* en pacientes con ELA_f y ELA_e, así como en la EP (Greenway *et al.*, 2006; Van Es *et al.*, 2011). Otros genes responsables como *VAPB*, *SQSTM1*, *SORT1* y *UBQLN2* representan un pequeño número de casos familiares y solo tienen una presencia residual en casos esporádicos (Hocking, 2002; Nishimura *et al.*, 2004; Deng *et al.*, 2011; Fecto *et al.*, 2011; Belzil *et al.*, 2012). Es importante destacar que *UBQLN2* se transmite con un patrón de herencia ligada al sexo dominante.

En 2010 se identificó el gen *OPTN* como causa de ELA, tanto mutaciones heterocigotas como homocigotas (Maruyama *et al.*, 2010), con un patrón de herencia dominante o recesivo. Ya se sabía que las mutaciones en *OPTN* causaban glaucoma primario de ángulo abierto (POAG) y ataxia (Rezaie *et al.*, 2002), lo que reforzaba el vínculo entre la ataxia y la ELA. No obstante, las mutaciones en este gen parecen ser una causa rara de ELA (Solski *et al.*, 2012). Principalmente se han descrito en familias japonesas (Maruyama *et al.*, 2010; Iida *et al.*, 2011, 2012).

Continuando con los genes involucrados en la patología de la ELA, junto a otras patologías, las mutaciones de *FIG4* causan la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 4J, que es una neuropatía sensitivo-motora hereditaria autosómica recesiva, y en él también se han descrito mutaciones relacionadas con la ELA (De Leeuw, 2008; Chow *et al.*, 2009; Lenk *et al.*, 2011). Las mutaciones en *SPG11* (Daoud *et al.*, 2012) causan paraplejia espástica hereditaria, que se superponen con la ELP juvenil o ELA juvenil. Mutaciones en *SIGMAR1* también se han descrito principalmente en ELA juvenil (Al-Saif, Al-Mohanna and Bohlega, 2011).

En el caso de *TAF15* y *EWSR1* es importante señalar que han sido estudiados porque albergan motivos de reconocimiento de ARN similares a TDP-43 y FUS. Se encontraron seis familias con mutaciones en *TAF15* (Couthouis *et al.*, 2011; Ticozzi *et al.*, 2011) y tres casos esporádicos con variantes en *EWSR1* (Couthouis *et al.*, 2012).

Desde hace apenas unos años, gracias al desarrollo de la tecnología de secuenciación y a la creación de consorcios a nivel nacional e internacional, se comenzaron a realizar estudios de NGS con un número de muestras mucho más elevado, lo que permitió el aumento del conocimiento de muchos nuevos genes implicados en diversas patologías, como se puede ver a continuación en el caso de la ELA.

En 2014, un estudio de casos-control encontró un exceso de variantes raras dañinas en el gen *TUBA4A* (que codifica la proteína Tubulina Alfa 4a) en casos índice de ELA_f a través de datos de WES (Smith *et al.*, 2014). La alfa tubulina representa uno de los componentes principales de los microtúbulos. Curiosamente, entre los siete pacientes con ELA que portaban variantes raras, dos de ellos desarrollaron DFT y uno tenía un pariente de primer grado afectado de DFT. La participación de *TUBA4A* en la ELA se ha replicado recientemente en una cohorte de pacientes con ELA_e (Pensato *et al.*, 2015), pero no en una cohorte española de pacientes con DFT (Dols-Icardo *et al.*, 2016).

Además, en el mismo año 2014, las mutaciones en el gen *CHCHD10* se describieron como posibles responsables de ELA pura (Muller *et al.*, 2014) y en asociación con DFT, ataxia cerebelosa y miopatía (Bannwarth *et al.*, 2014; Chaussenot *et al.*, 2014; J. O. Johnson *et al.*, 2014; Dols-Icardo *et al.*, 2015). Su papel puede estar involucrado en la estabilidad mitocondrial (Cozzolino *et al.*, 2015).

A su vez, en 2015, mediante WES, se descubrió la implicación de *TBK1* como causante de ELA. Este gen está implicado en la unión y en la fosforilación de proteínas implicadas en la inmunidad innata y en la autofagia como OPTN y p62 (*SQSTM1*) (Cirulli *et al.*, 2015). Se documentó que la haploinsuficiencia de *TBK1* podría causar ELA y DFT (Freischmidt *et al.*, 2015).

Posteriormente, el análisis de estos mismos datos de WES reveló mutaciones en el gen *NEK1*, que codifica para una proteína serina/treonina quinasa involucrada en el control del daño del ADN y para la reparación adecuada del mismo (Brenner *et al.*, 2016). También ha sido identificado como

factor de riesgo a través de la utilización de la comparación de la frecuencia combinada de variantes raras en casos-control (Kenna *et al.*, 2016).

Para finalizar, uno de los últimos grandes hallazgos genéticos en describirse ha sido CCNF, consecuencia de la utilización de GWAS que identificó el locus en 16p.13.3 y del WES que identificó una mutación en CCNF. Tras un cribado de grandes proporciones se identificaron nuevas variantes tanto en ELA como en DFT, familiares y esporádicas. La proteína ciclina F provoca la ubiquitinación anormal y acumulación de proteínas ubiquitinadas como TDP-43, provocando indirectamente una degeneración neuronal (Williams *et al.*, 2016).

Finalmente, el último gen descrito hasta la fecha es KIF5A (Nicolas *et al.*, 2018) tras un GWAS comparando 20.806 casos de ELA y 59.804 controles, y un análisis de variantes raras en 1.138 casos índice de ELAf y 19.494 controles. Ambas aproximaciones identificaron a *KIF5A* como gen causante de ELA. Un hallazgo muy interesante es que las mutaciones localizadas en el dominio motor N-terminal son asociadas a paraparesia espástica hereditaria (*SPG10/HSP – Hereditary Spastic Paraplegia*) y Charcot-Marie-Tooth Tipo 2 (CMT2), mientras que las mutaciones asociadas a la ELA se encuentran principalmente en el dominio C-terminal. Estos resultados amplían el espectro del fenotipo resultante de las mutaciones en *KIF5A* y fortalecen el papel de los defectos del citoesqueleto en la patogénesis de la ELA.

Es importante señalar que, incomprensiblemente, las mutaciones en estos genes también se encuentran en pacientes aparentemente esporádicos.

Algunos de los genes principales, como *C9orf72*, *SOD1*, *TARDBP* y *FUS* juntos, representan aproximadamente el 60% de las ELAf y el 15% de los casos de ELAe, mientras que las mutaciones en otros genes se encuentran en menos o igual al 1% de los pacientes (Renton, Chiò and Traynor, 2014; Taylor, Brown and Cleveland, 2016; Corcia *et al.*, 2017) (*Figura 1*).

También hay que añadir la expansión de la repetición del trinucleótido CAG en el gen del receptor de andrógenos (AR) para casos con una ENM familiar de herencia ligada al cromosoma X recesiva denominada Enfermedad de Kennedy o atrofia muscular espinobulbar (AMEB) (La Spada *et al.*, 1991), cuyo diagnóstico clínico en ocasiones se confunde con AMP de lenta evolución, siendo clasificada como una posible ELA (en la *Tabla A - Anexo I* están numerados otros genes).

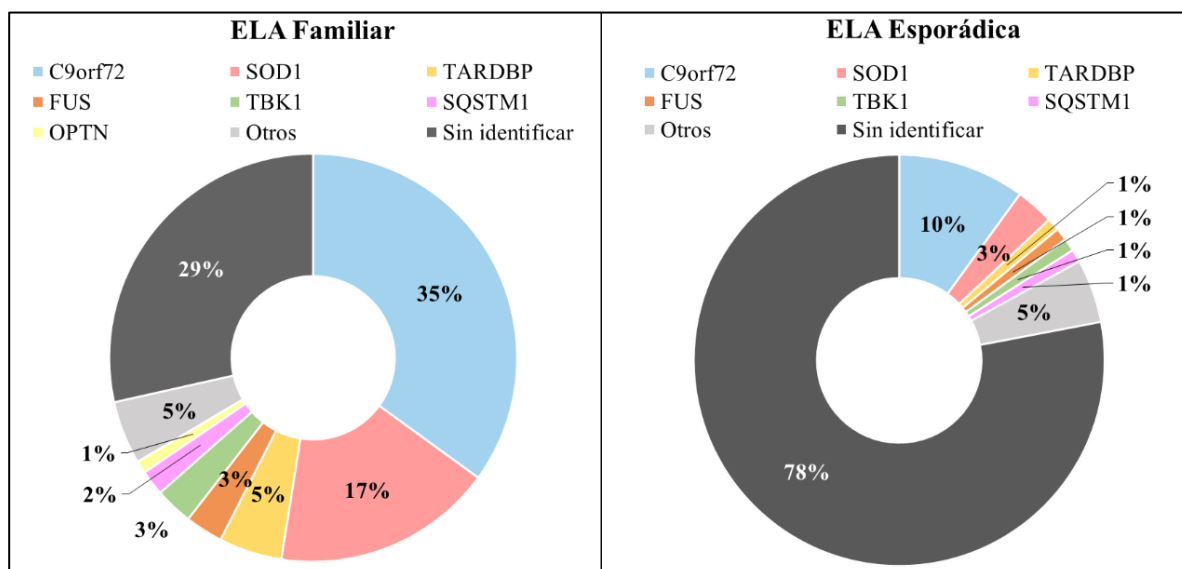


Figura 1. Porcentaje de contribución de los genes principales en los casos de ELAf y ELAe, así como el porcentaje de casos sin causa genética conocida.

1.7 Neuropatología de la ELA

El primer gran descubrimiento fue el hallazgo de la proteína TDP-43 como componente principal en las inclusiones citoplasmáticas ubiquitinadas y hasta el momento como característica neuropatológica más importante de la ELA (Neumann *et al.*, 2006). En estos agregados, la proteína TDP-43 está hiperfosforilada y se corta para generar fragmentos C-terminales anormales. Mientras que en las neuronas no afectadas el TDP-43 se localiza en el núcleo celular, en la ELA está ausente en los núcleos de las neuronas y hay inclusiones citoplasmáticas positivas a ubiquitina, lo que sugiere una redistribución nucleo-citoplasma de la proteína (Arai *et al.*, 2006; Neumann *et al.*, 2006).

Las inclusiones patológicas de TDP-43 representan más del 97% de los casos de ELA (**ELA-TDP**) (Ling, Polymenidou and Cleveland, 2013). La neuropatología de la ELA-TDP se caracteriza por la agregación citoplasmática aberrante de TDP-43 en las neuronas y la glía de la corteza motora primaria, los núcleos motores del tronco encefálico, la médula espinal y los tractos de materia blanca asociados (Mackenzie *et al.*, 2007). Algo característico es que no están presentes en pacientes con mutaciones en el gen *SOD1* (Mackenzie *et al.*, 2007).

Dos años después, se identificó FUS en las inclusiones de ubiquitina positiva sin inmunoreactividad a TDP-43 en varios casos de ELA (**ELA-FUS**) (Kwiatkowski *et al.*, 2009). Este rasgo neuropatológico apenas representa el 1% de los casos de ELA (Ling, Polymenidou and Cleveland, 2013). La presencia de las inclusiones patológicas de FUS se asocia con mutaciones en el gen *FUS* y se caracteriza por la acumulación citoplasmática de FUS en las neuronas y en la glía de la corteza motora, la médula espinal, el tronco encefálico, el estriado, el tálamo y la sustancia negra (Mackenzie, Rademakers and Neumann, 2010).

Por último, los pacientes con mutaciones en SOD1, no presentan inclusiones de TDP-43, sino inclusiones con cuerpos de Lewy en las neuronas motoras del asta anterior, que se tiñen de forma positiva para la proteína SOD1, ubiquitina, neurofilamentos fosforilados y algunas proteínas chaperonas (**ELA-SOD1**) (Mizusawa *et al.*, 1989; Shibata *et al.*, 1996), y representa al 2% de los pacientes.

2. DEMENCIA FRONTOTEMPORAL

2.1 Definición de DFT

La Degeneración Lobular Frontotemporal (DLFT) es un término para referirse a un síndrome clínico, anatómico-patológico y genéticamente heterogéneo. La demencia frontotemporal (DFT; OMIM: 600274) se refiere a la manifestación clínica del hallazgo patológico de la DLFT, caracterizándose por los cambios progresivos en el comportamiento, la personalidad y/o lenguaje (Neary *et al.*, 1998; McKhann *et al.*, 2001). Es importante reseñar que es la segunda forma más común de demencia cortical presenil tras la enfermedad de Alzheimer (EA) (Tolnay and Probst, 2002).

La edad media de inicio de la DFT es aproximadamente 58 años (Rosso *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2005). Aunque se han descrito casos que van desde los 20 a los 80 años, no es común un inicio anterior a los 40 o posterior a los 75 años.

La incidencia de la DFT en la población es de 2,7-4,1/100.000 habitantes al año mientras que la prevalencia media estimada de este síndrome se encuentra alrededor de 15-22/100.000 habitantes (Mercy *et al.*, 2008; Onyike and Diehl-Schmid, 2013).

La supervivencia tiene un rango de 3 a 14 años, dependiendo del fenotipo. La DS tiene la supervivencia más larga (12 años) mientras que en la APNF y la DFTvc apenas transcurren 9 años (Roberson *et al.*, 2005; Nunnemann *et al.*, 2011). La DFT-ENM tiene el pronóstico más desfavorable, ya que la muerte se produce dentro de los 2 a 3 años desde la aparición de los síntomas (Hodges *et al.*, 2003), aunque se ha informado de una supervivencia de hasta 5 años (Hu *et al.*, 2009; Broustal *et al.*, 2010).

Los datos de estudios familiares, clínicos y poblacionales muestran que alrededor de un 30-50% de los casos de DFT son de origen familiar, siendo la mayoría autosómicos dominantes (Bird *et al.*, 2003; Goldman *et al.*, 2005) considerándose el resto de origen esporádico.

2.2 Sistemas de clasificación de la DFT

Desde el punto de vista neuropatológico, la DLFT se puede clasificar según la presencia de inclusiones proteicas de tau (40-45% de los casos), TDP-43 (45-50%) y FUS (5%) (Mackenzie and Neumann, 2016). También se puede clasificar según su forma clínica en 6 subtipos: DFT variante conductual (DFTvc) que engloba el 50-60% de todos los casos, afasia progresiva no fluente (APNF)

en el 20% de los casos, demencia semántica (DS) en el 10%, y el porcentaje restante se reparte entre la parálisis supranuclear progresiva (PSP), la degeneración corticobasal (DCB) y la DFT-ELA (Lomen-Hoerth, Anderson and Miller, 2002).

Dentro de los fenotipos de DFT (*Figura 2*) que generalmente se relacionan con enfermedades del movimiento como la ELA, destacan la DFTvc, y dos formas de afasia progresiva primaria (APP), la APNF y la DS (Lomen-Hoerth, Anderson and Miller, 2002; Padovani *et al.*, 2007; Gorno-Tempini *et al.*, 2011).

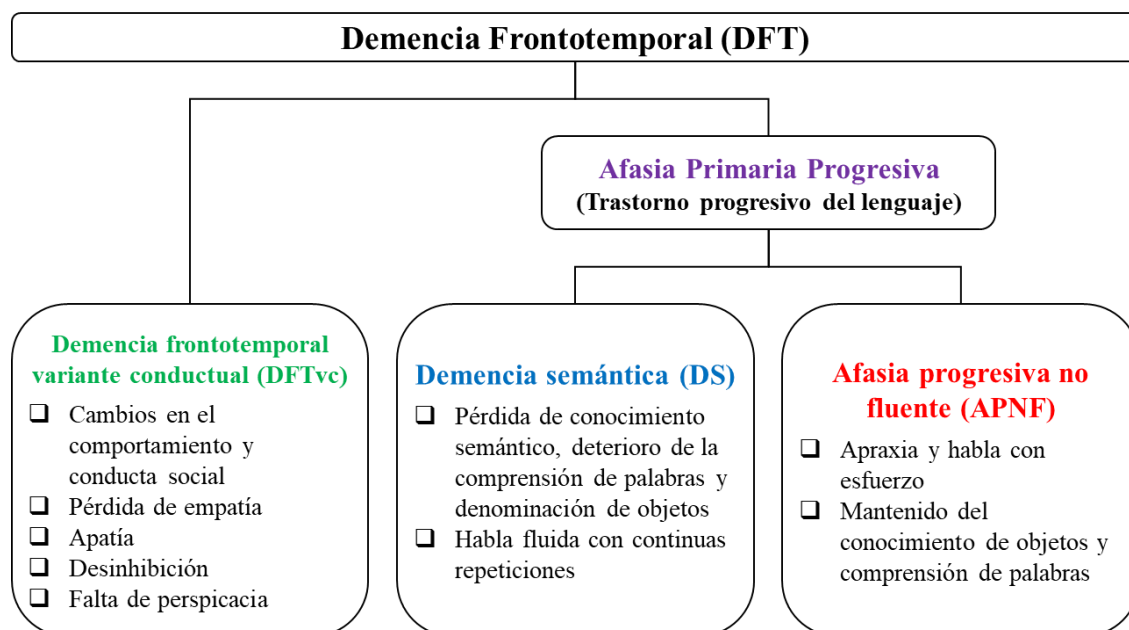


Figura 2. Descripción general de las presentaciones clínicas en los tres síndromes de demencia frontotemporal: demencia frontotemporal variante comportamental, demencia semántica y afasia progresiva no fluente. Fuente: (Johnson and Kumfor, 2018).

La DFTvc se caracteriza por cambios en la personalidad y la conducta social, con pérdida de la voluntad, disfunción ejecutiva, pérdida del pensamiento abstracto y disminución de la producción del habla (Rascovsky *et al.*, 2011). La DS se define por la pérdida específica de la comprensión del lenguaje, el deterioro del reconocimiento facial y de los objetos (agnosia visual). La ANFP se caracteriza por una reducción en la producción del habla, aumento de errores y dificultades en la recuperación de palabras que resultan en mutismo e incapacidad para comunicarse. Todos los subtipos tienen una preservación relativa de la memoria, al menos en las primeras etapas (Tolnay and Probst, 2002; Mackenzie and Rademakers, 2007).

2.3 Genética de la DFT

El primer gen identificado en la DFT fue *MAPT* (Hutton *et al.*, 1998), representando entre el 2-11% de todos los casos de DFT (Rohrer and Warren, 2011). Se encuentran principalmente en individuos con DFT típica. También se han identificado mutaciones en individuos con parálisis supranuclear progresiva (PSP) y degeneración corticobasal (DCB), así como en pacientes con rasgos parkinsonianos y demencia asociada a epilepsia (Kertesz, 2003). La mayoría de las mutaciones se

localizan en los exones 9 a 13 que codifican para los dominios de unión a los microtúbulos y las regiones flanqueantes. Casi todas las mutaciones muestran su efecto a través de un mecanismo de ganancia de función tóxica, produciendo normalmente la reducción de la capacidad de tau para interactuar con los microtúbulos (Ingram and Spillantini, 2002).

Hasta 2005 no se identifica una nueva vinculación genética con la DFT, tratándose del gen *CHMP2B* (Skibinski *et al.*, 2005), que sin embargo, posteriormente se ha visto que su contribución es secundaria.

Posteriormente, se identificaron variantes patogénicas en *GRN* (Baker *et al.*, 2006; Cruts *et al.*, 2006), pasando a considerarse como uno de los genes principales en la patología de la DFT. Se han descrito variantes relacionadas con DFTvc, APP, demencia asociada con trastornos del movimiento como el parkinsonismo, y la DCB (Kertesz, 2003; Gass *et al.*, 2006; Le Ber *et al.*, 2007).

En 2011, como ya se comenta en el *epígrafe 1.5*, se descubrió la implicación de la expansión de la repetición en el intrón 1 en la DFT, pasando a ser gen principal en la DFT. También, volver a destacar el gradiente norte-sur de afectados en Europa (*Tabla 2*).

La mayoría de los casos confirmados genéticamente tienen mutaciones descritas en los genes *CHMP2B*, *FUS*, *GRN*, *MAPT*, *VCP* y *TARDBP*, así como la expansión de la repetición del hexanucleótido en *C9orf72* (Cruts, Theuns and Van Broeckhoven, 2012; Olszewska *et al.*, 2016). Sin embargo, al igual que en la ELA, se han descrito mutaciones en genes que representan causas raras de DFT y de los que apenas se conoce su implicación (*Tabla B - Anexo I*).

En etapas iniciales, la EA y la DFT pueden compartir características clínicas, lo que a veces dificulta la diferenciación entre las dos enfermedades. Varios estudios han informado sobre mutaciones en *MAPT*, *GRN* y *C9orf72* asociadas a pacientes con EA diagnosticados clínicamente, e incluso se ha sugerido la posibilidad de que en la EA de inicio tardío, las mutaciones en *MAPT* y *GRN* pueden ser tan comunes como las mutaciones en la *APP* (proteína precursora beta amiloide), *PSEN1* (presenilina) y *PSEN2* (presenilina 2), que son las mutaciones genéticas clásicas asociadas con EA familiar (Cruchaga *et al.*, 2012; Wojtas *et al.*, 2012; Gómez-Tortosa *et al.*, 2013). Igualmente, se han descrito mutaciones de los genes *PSEN1* y *PSEN2* en casos de DFT (Mendez and McMurtry, 2006; Gallo *et al.*, 2010; Raux *et al.*, 2012).

2.4 Neuropatología de la DFT

La clasificación de la DLFT ha experimentado grandes cambios en los últimos 30 años, en relación con los avances en el conocimiento de sus bases moleculares. Hasta los años 90, las clasificaciones eran descriptivas, basadas en las características histológicas, y con una terminología que resultaba algo vaga: “enfermedad de Pick”, “demencia sin características histológicas distintivas”, etc. (Constantinidis, Richard and Tissot, 1974; Brun, 1987; Knopman *et al.*, 1990). Posteriormente, se describió la presencia de inclusiones positivas para ubiquitina en una gran mayoría

de estos casos, reemplazándose el nombre de “demencia sin características histológicas distintivas” por DLFT con inclusiones positivas para ubiquitina (DLFT-U) (Tolnay and Probst, 1995; Rossor *et al.*, 2000).

Poco después, se describió la acumulación de formas anormalmente hiperfosforiladas de la proteína tau en las neuronas y en la glía, pasando a denominar a estas formas **DLFT-tau**. El término patológico DLFT-tau comprende un espectro que incluye PSP, DCB, enfermedad de granos argirófilos, taupatía con inclusiones globulares gliales y enfermedad de Pick (Delacourte *et al.*, 1996; Sergeant *et al.*, 1997; Lee and Leurgers, 2013; Spillantini and Goedert, 2013). Todas tienen depósitos de tau 4R salvo la DLFT que pueden tener acúmulos de 3R o 4R, y la enfermedad de Pick en la predominan los depósitos de tau 3R. La patología DFT-tau está presente en aproximadamente el 40% de los casos de DFT (Ling, Polymenidou and Cleveland, 2013).

En 2006 se determinó que la proteína TDP-43 era el componente principal de las inclusiones positivas para ubiquitina en la mayoría de los casos de DLFT-U, pasando a denominarse **DLFT-TDP** (Arai *et al.*, 2006; Neumann *et al.*, 2006). En torno al 45% de los casos de DFT muestran patología de DLFT-TDP en la autopsia. La inmunorreactividad de TDP-43 se encuentra en inclusiones citoplasmáticas neuronales (NCIs), inclusiones intranucleares neuronales (NIIs), inclusiones oligodendrogiales y neuritas distróficas (DNs) en el neocortex frontotemporal y células granulosas del giro dentado.

Tras estos descubrimientos, todavía había alrededor del 10% de los casos de DLFT-U con inclusiones de ubiquitina negativas para tau y TDP-43. Este último porcentaje lo rellenó la descripción de agregados de proteínas FUS (DLFT-FUS). Este tipo de inclusiones están presentes en la enfermedad por inclusión neuronal de filamentos intermedios, enfermedad de cuerpos de inclusión basófilos y DLFT-U atípico (a-DLFT-U) según los tipos de inclusión y su distribución. Dos características muy comunes en los casos de DLFT-FUS son la atrofia temprana del caudado y la esclerosis del hipocampo (Neumann *et al.*, 2009; Lashley *et al.*, 2011).

Posteriormente, se descubrió que dos proteínas también del grupo de la familia de proteínas FET (EWS y TAF15) y transportina 1 (TRN1) formaban parte de las inclusiones patológicas FUS positivas, y por lo tanto, DLFT-FUS pasó a llamarse **DLFT-FET** (Neumann *et al.*, 2011; Davidson *et al.*, 2013) cuyos casos son casi siempre esporádicos (Mackenzie, Rademakers and Neumann, 2010).

Por último, hay un pequeño porcentaje de casos que presentan inclusiones positivas para p62 y negativas para TDP-43 y FUS en la autopsia. Estos casos sería el 4º subtipo, denominado **DLFT-UPS**, por la presencia de inclusiones del sistema ubiquitina-proteosoma (Sieben *et al.*, 2012).

3. ESPECTRO CONTINUO ELA-DFT

3.1 Clínica

A pesar de que desde hace casi 100 años fuera descrito por primera vez (van Bogaert, 1925), solo hace 10 años la ELA y la DFT han comenzado a considerarse como un síndrome neurodegenerativo común. Así pues, hay casos de ELA pura, casos de DFT pura y casos en los que ambas patologías pueden ocurrir en distintos miembros de una familia o en comorbilidad (mismo individuo con ELA y DFT) (Hardy and Rogaeva, 2013).

Al menos en algunos casos, la ELA y la demencia frontotemporal son diferentes manifestaciones del mismo proceso patológico subyacente, por lo que hay individuos con ELA, otros con DFT y otros con ambas patologías (Mackenzie, Rademakers and Neumann, 2010). Este hecho también ha afectado mucho a la capacidad de estudiar la ELA, ya que antes de que esta superposición fuera ampliamente reconocida, los individuos con DFT a menudo eran excluidos de estudios genéticos y las comunidades investigadoras de ELA y DFT generalmente no trabajaban juntas.

3.2 TDP-43

El descubrimiento de TDP-43 como el componente principal de las inclusiones de ubiquitina positiva en los casos de ELA y DFT es la observación más importante que respalda la superposición patológica entre ambos síndromes (Arai *et al.*, 2006; Neumann *et al.*, 2006). Asimismo, un estudio posterior que incluyó datos clínicos y neuropatológicos de 102 casos de ELA revelaba que la disfunción ejecutiva y las características similares a la DFT se correlacionaban con la patología de TDP-43 en las regiones frontotemporales (Brettschneider *et al.*, 2012). Posteriormente, otro trabajo proporcionó pruebas de que el mecanismo de progresión de la patología de TDP-43 en los casos clínicamente presentados con DFTvc y clasificados como DLFT-TDP en la autopsia es similar a lo observado en los casos de ELA sin comorbilidad (Brettschneider *et al.*, 2014).

Las inclusiones citoplasmáticas en las neuronas y en las células gliales que contienen TDP-43, se encuentran en el 97-98% de todos los casos de ELA y aproximadamente en el 45-50% de los casos de DFT (Neumann *et al.*, 2006).

3.3 Genética en el continuo ELA-DFT

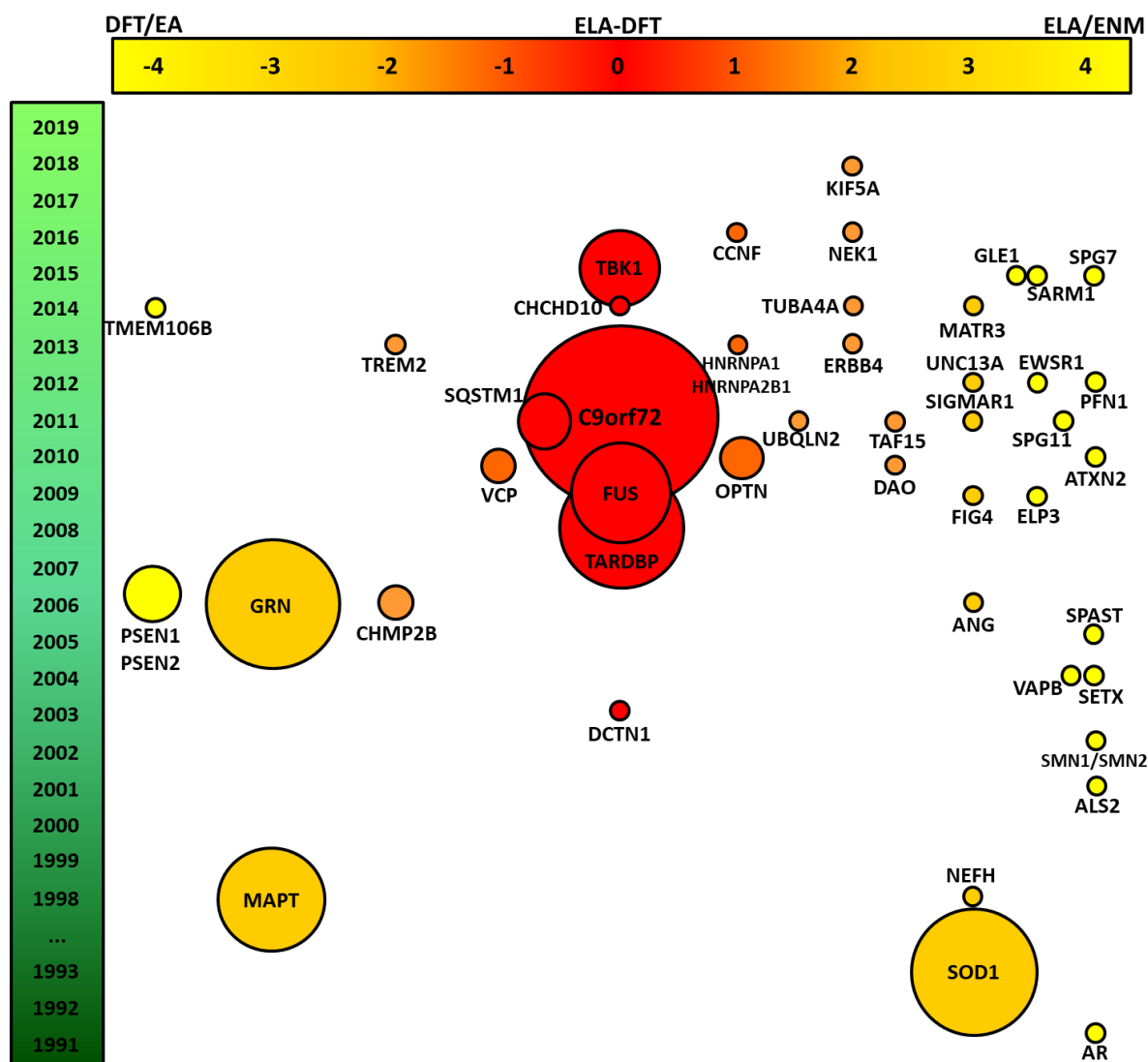
Para comenzar, volver a hacer hincapié en la implicación de la ER en C9orf72 como causa mayoritaria de la ELA y la DFT a partir de su reciente descubrimiento en el año 2011 y su posterior ligación a ambas enfermedades y a los pacientes concomitantes (Majounie *et al.*, 2012).

Como ya se nombró anteriormente, la primera causa mendeliana identificada para la ELA fue el hallazgo de mutaciones en el gen *SOD1* (Rosen *et al.*, 1993), y la primera causa mendeliana identificada para la DFT fueron mutaciones en el gen *MAPT* (Hutton *et al.*, 1998). Ambos casos de

mutaciones, tanto en *SOD1* como en *MAPT*, siempre han sido casos dentro de la ELA y DFT puras respectivamente, aunque los fenotipos de los portadores hayan sido variables. Sin embargo, la identificación de mutaciones en *TARDBP* (Sreedharan *et al.*, 2008) y *FUS* (Kwiatkowski *et al.*, 2009) para la ELA y mutaciones en *GRN* (Baker *et al.*, 2006; Cruts *et al.*, 2006) y *CHMP2B* (Skibinski *et al.*, 2005) para DFT, seguido por la detección de mutaciones en estos genes en pacientes con cualquiera de estos trastornos, aunque sea en bajos porcentajes (Parkinson *et al.*, 2006; Sleegers *et al.*, 2008; Broustal *et al.*, 2010; Cox *et al.*, 2010; Van Langenhove *et al.*, 2010; Huey *et al.*, 2012), ha contribuido a la idea de un continuo ELA-DFT.

Además, la reciente identificación de mutaciones en ambos trastornos en *VCP* (Watts *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2010), *SQSTM1* (Fecto *et al.*, 2011; Rubino *et al.*, 2012; Le Ber *et al.*, 2013), *OPTN* (Maruyama *et al.*, 2010; Kamada *et al.*, 2014), *UBQLN2* (Deng *et al.*, 2011; Vengoechea *et al.*, 2013), *PFN1* (Wu *et al.*, 2012), *CHCHD10* (Bannwarth *et al.*, 2014), *TUBA4A* (Smith *et al.*, 2014), *TBK1* (Cirulli *et al.*, 2015) y especialmente la ER en *C9orf72* (Alan E Renton *et al.*, 2011; DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011), han impulsado de forma definitiva la noción de un síndrome continuo ELA-DFT en el que ambas patologías conforman los extremos del espectro (Figura 3).

En particular, la expansión de la repetición del hexanucleótido en *C9orf72* (Alan E Renton *et al.*, 2011; DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011) se considera el vínculo genético central entre ambas patologías, así como lo supone a nivel patológico la presencia de los agregados de TDP-43 (Neumann *et al.*, 2006). Actualmente, está bien establecida la superposición clínica, patológica y genética entre la ELA y la DFT (Burrell *et al.*, 2016).



4. EL CAMBIO DE ESCENARIO EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Tradicionalmente se ha utilizado la secuenciación Sanger (considerada todavía como la técnica estándar) junto con la detección de la expansión en *C9orf72* como método de diagnóstico genético en pacientes con ELA y DFT. Sin embargo, en los últimos años, el desarrollo de técnicas de secuenciación de última generación (NGS) ha reducido los costes y ha permitido crear paneles génicos para analizar multitud de genes simultáneamente, así como la secuenciación del exoma completo (WES) e incluso la secuenciación del genoma completo (WGS). Esto ha llevado a un mayor análisis de los genes asociados con menor frecuencia a la ELA y también al descubrimiento de pacientes con

variantes en más de un gen asociado a ELA (casos potencialmente oligogénicos) (Luigetti et al., 2011; van Blitterswijk et al., 2012).

Además, las nuevas metodologías existentes de secuenciación masiva han permitido una explosión de conocimiento de nuevos genes como *CCNF* (Williams et al., 2016), *NEK1* (Brenner et al., 2016; Kenna et al., 2016), *TUBA4A* (Smith et al., 2014) o *KIF5A* (Nicolas et al., 2018) (y otros que se señalan en las *Tablas A y B - Anexo I*), así como del aumento del número de variantes conocidas en genes previamente ya descritos.

No solamente ofrecen la posibilidad de una secuenciación más completa, sino que las condiciones son mucho más favorables en términos económicos y de tiempo de preparación (*Tabla 3*). De hecho, desde hace ya varios años, el estudio del exoma dirigido ha sido recomendado como el estándar en el diagnóstico genético de pacientes con trastornos clínicos genéticamente heterogéneos (Gomez and Das, 2014; Miyatake and Matsumoto, 2014). Un gran inconveniente de la NGS es que esta metodología es incapaz de detectar expansiones como la ER en *C9orf72*, o las de CAG en *AR* y *ATXN2*.

	Sanger	Panel génico	Exoma	Genoma
Objetivo	Hasta 1000 pb	Hasta 150 genes	Toda la región codificante del genoma	Genoma completo
Tiempo	1 día	<7 días	<7 días	<7 días
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> - Alta precisión - Regiones flexibles - Fácil análisis 	<ul style="list-style-type: none"> - Costo bajo - Tiempo disminuido - Fácil análisis 	<ul style="list-style-type: none"> - Tiempo disminuido - Descubrimiento de nuevos genes - Reanalizable ante nuevos genes 	<ul style="list-style-type: none"> - Tiempo disminuido - Posible detectar variante en región no-codificante
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> - Tiempo elevado - Costo elevado - Inviabile para proyectos a gran escala 	<ul style="list-style-type: none"> - Enfocado al diagnóstico genético 	<ul style="list-style-type: none"> - Coste mayor que el panel génico - No posible detectar variantes en región no-codificante - Necesaria confirmación por Sanger 	<ul style="list-style-type: none"> - Coste elevado - Análisis complicado por cantidad de datos - Necesaria confirmación por Sanger

Tabla 3. Comparación de los diferentes tipos de secuenciación masiva y secuenciación Sanger.

5. OLIGOGENIA

El concepto de herencia oligogénica en la ELA se planteó cuando se encontró que algunos pacientes con ELA^f con una mutación causal conocida también albergaban una mutación adicional en otro gen de riesgo de ELA. Gracias a la WES, pueden secuenciarse todos los genes simultáneamente en muchos pacientes, lo que permite la búsqueda de causas genéticas en casos esporádicos y la oportunidad de buscar una posible herencia oligogénica (Pang et al., 2017a).

Con el uso de estas técnicas en un estudio, se demostró que hay un enriquecimiento significativo de alelos raros perjudiciales en los pacientes con ELA en comparación con los controles, y que el 60% de los pacientes con ELA^e tenían esas variantes raras (Couthouis et al., 2014). En otro

estudio se expuso que el 60,8% de las ELAe tenían al menos una y el 19,5% tenía dos o más variantes raras (Pang *et al.*, 2017b).

Asimismo, el aumento del número de variantes de riesgo se asocia con una edad más temprana de inicio (Cady *et al.*, 2015) y una menor supervivencia (Pang *et al.*, 2017b).

6. PLEIOTROPÍA

Las posibles explicaciones que dan lugar a la teoría pleiotrópica son las siguientes (Solovieff *et al.*, 2013): **(a)** enfermedades clínicamente similares pueden ser causadas por un gran número distinto de variantes genéticas; **(b)** diferentes mutaciones en un mismo gen, e incluso a veces una misma mutación, puede estar asociada a diferentes fenotipos de enfermedades neurodegenerativas. Se pueden ver unos ejemplos de cada tipo en la *Tabla 4*.

Diversos fenotipos con...	Posible mecanismo	Ejemplos	Referencias
Diferentes mutaciones en el mismo gen	Diferentes mutaciones pueden tener diferentes efectos en la regulación	Mutaciones en <i>VCP</i> se encuentran en ELA, DFT y MCI	(Nalbandian <i>et al.</i> , 2011)
	Diferentes variantes confieren distintos niveles de patogenicidad	En <i>SOD1</i> : la mutación p.A4V da lugar a un fenotipo muy agresivo y p.D90A no es patogénica en heterocigosis en la población escandinava	(Al-Chalabi <i>et al.</i> , 2012)
Misma mutación en el mismo gen	Presencia de un gen modificador	Un alelo en <i>TMEM106b</i> es protector en pacientes de DFT pero no de ELA en portadores de la ER en <i>C9orf72</i>	(Van Blitterswijk <i>et al.</i> , 2014)
	Herencia oligogénica	Pacientes de ELA ^f con mutación en <i>SOD1</i> y variantes raras adicionales en genes de ELA, reducen la supervivencia	(Pang <i>et al.</i> , 2017b)

Tabla 4. Ejemplos de pleiotropía en enfermedades neurológicas y posibles mecanismos. Fuente: (Pang *et al.*, 2017a).

De hecho, una parte significativa de la heredabilidad de la ELA no puede explicarse si solo se considera un modelo monogénico, mientras que las interacciones entre múltiples genes podrían explicar parte de la gran variabilidad fenotípica observada entre individuos que portan mutaciones idénticas así como la penetrancia incompleta observada en algunas familias (Marangi and Bryan J. Traynor, 2015a).

7. FACTORES DE RIESGO DE ELA Y DFT

Como caso curioso está la expansión de la repetición de poliglutaminas en *ATXN2*. En los casos control la mayoría poseen una longitud de 22-23 repeticiones, mientras que la expansión ≥ 34 repeticiones causa SCA2 autosómica dominante (Imbert *et al.*, 1996) y en algunos pacientes EP (Gwinn-Hardy *et al.*, 2000), mientras que en los casos de longitud intermedia (27-33) se ha descrito como factor de riesgo en la ELA (Elden *et al.*, 2010).

También se ha descrito el gen *TREM2*, como causante de DFT hereditario en homocigosis (Le Ber *et al.*, 2014) y como factor de riesgo para EA (Guerreiro *et al.*, 2013) y DFT (Borroni *et al.*, 2014) en heterocigosis.

Otros factores de riesgo se encuentran nombrados en la *Tabla A* y en la *Tabla B - Anexo I*.



Objetivos

La arquitectura genética de la ELA constituye una de las principales dificultades para comprender el origen causal de la etiología de la ELA. A su vez, ha sido uno de los campos con mayor avance en los últimos años gracias al gran aumento de posibilidades tecnológicas para realizar estudios genéticos y genómicos. Lo que se ha conseguido mediante estos avances son dos aspectos básicos: el conocimiento de nuevos genes de riesgo y causantes de ELA, así como el aumento del número de casos genéticamente diagnosticados tanto para la ELA familiar como para la ELA esporádica.

Por otra parte, también ha aumentado el número de variantes de significado incierto que dificulta un adecuado consejo genético.

Con la necesidad de dilucidar el estado actual del panorama genético en esta complicada enfermedad y de intentar desenmarañar cuáles han de ser las prioridades del diagnóstico molecular, se presenta un objetivo central fragmentado en diferentes objetivos parciales.

El **objetivo principal** de esta tesis doctoral es la caracterización genética de los pacientes con ELA y DFT de la población española.

Los **objetivos parciales** serían los siguientes:

1. Valoración de la expansión de la repetición de trinucleótidos en el **gen AR como factor de riesgo** de ELA y/o DFT
2. Demostración del posible **origen somático** de la ELA
3. Puesta a punto de diferentes aproximaciones de **secuenciación masiva** como herramienta diagnóstica y herramienta de investigación
4. **Caracterización genética** de la población española con ELA y/o DFT
5. Análisis de la **oligogenia**
6. Diseño de un **algoritmo molecular diagnóstico** en pacientes con ELA y/o DFT



Material y métodos

1. PACIENTES

1.1 Procedencia de las muestras

En el Laboratorio de Investigación en ELA del Hospital Universitario 12 de Octubre se reciben muestras de sangre de pacientes con ELA de prácticamente la totalidad del territorio español, ya que es conocido por ser uno de los laboratorios de referencia nacional en estudios genéticos de ELA. Comprensiblemente, dada su ubicación, aproximadamente el 80% de las muestras proceden de centros hospitalarios de la Comunidad Autónoma de Madrid.

Dentro de las muestras de sangre periférica cabe destacar la aportación de nuestro propio centro, a través del trabajo realizado en la Unidad de ELA dirigida por el Dr. Jesús Esteban Pérez y la Unidad de Demencias dirigida por el Dr. Alberto Villarejo Galende. Además, colaboran activamente en la elaboración de las historias clínicas de los pacientes y en ocasiones proponen una primera valoración sobre el enfoque del diagnóstico de laboratorio.

Por otra parte, en colaboración con la Fundación CIEN (Centro de Investigación de Enfermedades Neurológicas) perteneciente al CIBERNED, dirigido por el Dr. Alberto Rábano Gutiérrez del Arroyo, se realizó la recopilación de muestras de hemisferio cerebeloso y médula espinal cervical procedente de necropsias de pacientes con ELA.

Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito de acuerdo con las directrices del comité ético. La aprobación del estudio genético en pacientes con ELA y DFT ha sido realizada por el CEIm (Comité de Ética de la Investigación con medicamentos (CEIm)) tras su nueva denominación y constitución bajo el paraguas del Real Decreto 1090/2015 (Anexo III).

1.2 Clasificación de los pacientes

La cohorte de pacientes analizada por diferentes métodos de secuenciación genético alcanza el número de 1336 casos índice. En este número se incluyen 1156 pacientes con ELA y 180 pacientes con DFT. De estos dos grupos a su vez se puede extraer una serie de 160 pacientes del grupo ELA-DFT. Para entender adecuadamente la magnitud del estudio llevado a cabo, se van a distinguir diferentes grupos de pacientes según la técnica de secuenciación aplicada (*Tabla 5*):

Secuenciación empleada	Pacientes totales	Pacientes durante tesis
Sanger	1336	394
Panel génico personalizado	103	103
WES	193	107
C9orf72	1309	533

Tabla 5. Representación de los casos índice totales así como de los casos índice exclusivamente analizados durante esta tesis. También se indica el tipo de secuenciación utilizada.

En referencia a los casos índice, se posee un total de 173 ADNs procedentes de familiares, de los cuales también se ha realizado su estudio mediante la aplicación de diferentes técnicas, como se puede ver en la *Tabla 6*.

Clínica	Número	Secuenciación	Variante presente
Asintomático	129	9 rechazaron	-
		120 Sanger	39
		1 WES	1
Afectos	44	44 Sanger	32
		1 panel génico dirigido	1
		6 WES	3

Tabla 6. Representación del número de familiares asintomáticos y afectados de los 1336 casos índice. También se representa el tipo de secuenciación empleada y si la variante del caso índice estaba presente en el familiar.

Además, los 1336 pacientes van a ser clasificados a su vez según la presencia o ausencia de una historia familiar positiva en ELA, DFT o enfermedades neurodegenerativas y/o neurológicas que se encuentran íntimamente relacionadas.

Así pues, por una parte hay un número total de 1156 pacientes de ELA subdivididos en 143 ELAf (incluyendo estrictamente solo antecedentes familiares de ELA, *Tabla 7*) y 1044 ELAe. Y por otra parte, se disponen de 180 pacientes con DFT divididos en 37 DFTf (incluyendo estrictamente solo antecedentes familiares de DFT, *Tabla 8*) y 143 DFTe.

Para terminar de clasificar a los pacientes, se crea el grupo extra en el que se incluyen pacientes con comorbilidad de ELA y DFT así como pacientes con ELA y antecedentes familiares de DFT, y viceversa. Este grupo se denomina “ELA-DFT” y para ciertos análisis de los resultados tendrá un peso específico (*observar epígrafe 1.3 Características de los pacientes* así como la *Tabla 9*). Así pues, desde este punto en adelante, cuando se especifique grupo ELA-DFT, no son pacientes clasificados aparte, sino que son pacientes extraídos tanto del grupo ELA como del grupo DFT que presentan esta característica distintiva.

Cabe destacar la inclusión de 45 pacientes con ELA juvenil, es decir, con inicio anterior a los 40 años de edad. Dentro de este grupo, 10 de estos 45 pacientes poseen antecedentes familiares de ELA y/o DFT.

1.3 Características de los pacientes

Las técnicas empleadas son diferentes debido a las distintas características de los pacientes. Por ejemplo, en pacientes con ELA de inicio temprano (ELA juvenil), la secuenciación Sanger incluye siempre los genes *FUS* y *TARDBP*, incluso a veces *SETX*.

De esta manera, se van a tener en cuenta las siguientes variables:

- Edad de inicio
- Sexo
- Forma de inicio: bulbar / espinal
- Fenotipo de inicio: NMS+NMI / NMS / NMI

Las características demográficas y de la enfermedad para los 1156 pacientes con ELA secuenciados se muestran en la *Tabla 7*.

Total casos de ELA	1156
Pacientes con ELA que desarrollan DFT (número, %)	92 8,0%
Pacientes con antecedentes de ELA (número, %)	143 12,4%
Pacientes con antecedentes de DFT (número, %)	43 3,7%
Pacientes con antecedentes de ELA, DFT u otras enfermedades neurodegenerativas relacionadas (número, %)	296 25,6%
Casos caucásicos (%)	94,2%
Sexo femenino (%)	43,4%
Inicio espinal (%)	64,2%
Edad de inicio (media en años, \pm DS)	57,8 \pm 14,9
Edad de inicio (intervalo en años)	10 - 95
Supervivencia (media en meses, \pm DS)	46,9 \pm 37,7
Supervivencia (intervalo en meses)	6 - 360

Tabla 7. Datos de etnia, lugar de inicio, y edad de inicio no se tuvo de 46, 100 y 341 pacientes respectivamente. Los datos de supervivencia estuvieron disponibles en 499 pacientes.

A su vez, la *Tabla 8* muestra las características demográficas y de la enfermedad para los 180 pacientes con DFT secuenciados.

Total casos de DFT	180
Pacientes con DFT que desarrollan ELA (número, %)	28 15,6%
Pacientes con antecedentes de DFT (número, %)	37 20,5%
Pacientes con antecedentes de ELA (número, %)	23 12,8%
Pacientes con antecedentes de DFT, ELA u otras enfermedades neurodegenerativas relacionadas (número, %)	79 44,1%
Casos caucásicos (%)	100%
Sexo femenino (%)	79 44,1%
Edad de inicio (media en años, \pm DS)	63,6 \pm 9,9
Edad de inicio (años)	38 - 85
Supervivencia (media en meses, \pm DS)	64,2 \pm 52,5
Supervivencia (meses)	5 - 189

Tabla 8. Datos de etnia y edad de inicio no se tuvo de 1 y 59 pacientes respectivamente. Los datos de supervivencia estuvieron disponibles en 26 pacientes.

Por último, la *Tabla 9*, muestra los números del grupo ELA-DFT. En este grupo se engloban las filas “Pacientes con ELA que desarrollan DFT” y “Pacientes con antecedentes de DFT” de la *Tabla 7*, así como las filas “Pacientes con DFT que desarrollan ELA” y “Pacientes con antecedentes de ELA” de la *Tabla 8*.

Casos ELA-DFT totales	167
(1) Pacientes con DFT que desarrollan ELA (número, %) ¹	28 16,8% ¹
(2) Pacientes con ELA que desarrollan DFT (número, %) ¹	92 55,1% ¹
(1) con HFP de ELA y/o DFT + (2) con HFP de ELA y/o DFT + Pacientes de ELA con HFP de DFT y viceversa	69 41,3%
(1) con HFP de ELA y/o DFT + (2) con HFP de ELA y/o DFT + Pacientes de ELA con HFP de DFT y viceversa, u otras enfermedades neurodegenerativas relacionadas (número, %)	91 54,5%
Casos caucásicos (%)	98,2%
Sexo femenino (%)	41,3%
Edad de inicio (media en años, \pm DS)	60,9 \pm 14,0
Edad de inicio (años)	36 - 95
Supervivencia (media en meses, \pm DS)	44,9 \pm 32,6
Supervivencia (meses)	5-181

Tabla 9. Datos de etnia y edad de inicio no se tuvo de 2 y 26 pacientes respectivamente. Los datos de supervivencia estuvieron disponibles en 70 pacientes. El (¹) indica que los % de esta tabla son en referencia a “Casos ELA-DFT totales”. [HFP = Historia Familiar Positiva].

En las *Tablas 7, 8 y 9*, cuando se expresa el porcentaje de pacientes con antecedentes de ELA, DFT u otras enfermedades neurodegenerativas relacionadas, se incluyen como positivos aquellos con al menos un familiar de primer o segundo grado que también hubiera padecido ELA, DFT u otra de las enfermedades neurodegenerativas íntimamente relacionadas (EA, EP, ataxia, CMT, *HSP*, EH, trastornos psiquiátricos).

2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DEL ADN

2.1 Extracción de ADN de sangre

La extracción de ADN a partir de sangre periférica total congelada (-20°C) se realiza según las especificaciones del kit de extracción de ADN Illustra Nucleon Genomic (GE Healthcare Life Sciences) ajustando en su paso final la concentración de ADN a 200 ng/μl con TE (1X).

2.2 Extracción de ADN de tejido congelado

La extracción de ADN de cortes de hemisferio cerebeloso y de médula espinal cervical conservados a -80°C, se realiza mediante el kit de extracción de ADN genómico (NucleoSpin Tissue, Macherey-Nagel).

3. MÉTODOS DE SECUENCIACIÓN

3.1 Secuenciación Sanger

La metodología realizada para la secuenciación Sanger (Sanger, Nicklen and Coulson, 1977) consta de seis etapas diferenciadas: realización de la PCR del fragmento deseado, purificación y cuantificación del producto de PCR, realización de la reacción de secuenciación, precipitación del producto de la reacción de secuenciación, electroforesis capilar y análisis del electroferograma.

La preparación de la PCR se realiza según los reactivos y volúmenes necesarios para la amplificación de cada fragmento de interés (*Tabla 10*) programándose el termociclador (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems) a las temperaturas apropiadas para cada PCR (*Tabla 11*).

Reactivo	Volumen
Buffer, 10X (NZYTech)	2,5 μL
dNTPs, 1 mM (NZYTech)	5 μL
MgCl ₂ , 0,75 mM (NZYTech)	1 μL
Cebador sentido	0,5 μL
Cebador antisentido	0,5 μL
Taq Polimerasa (NZYTech)	0,25 μL
ADN molde	1,5 μL
H ₂ O	13,25 μL

Tabla 10. Reactivos y volúmenes empleados en la PCR de los fragmentos de interés del gen *SOD1* como ejemplo representativo del resto de PCRs.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	5'	1
94°C	30''	30
60°C	30''	
72°C	1'	
72°C	10'	
4°C	∞	1

Tabla 11. Programa de termociclador empleado en la PCR de los fragmentos de interés del gen *SOD1* como ejemplo representativo del resto de programas empleados.

Para comprobar si se ha amplificado el fragmento deseado se prepara un gel de agarosa (Agarose MS-8, Laboratorios CONDA/Pronadisa) al 1% con TAE (0,5X). Para poder llevar a cabo el posterior revelado, se añaden 3 µL GreenSafe Premium (NZYTech) por cada 50 mL de gel preparado. Una vez se dispone del gel de agarosa, se procede al cargado de las muestras, mezclando previamente 5 µL del producto de PCR con 2 µL de tampón de carga (5x Gel Load Reaction Buffer, NZYTech). Además de las muestras, se incluyen en otro carril del gel 3 µL del patrón de pesos moleculares NZYDNA Ladder VII (NZYTech). Las electroforesis se llevan a cabo en las cubetas electroforéticas ultrarrápidas RunOne™ Electrophoresis Cell (Embi Tec) a 100 V durante 15', que contienen buffer de electroforesis TAE (0,5X). Terminada la electroforesis se revela el gel en el transiluminador de luz UV U:Genius Compact Imaging System (Syngene). Se verifica que se ha amplificado el fragmento de estudio comparándolo con el patrón de pesos moleculares.

Tras comprobar que se ha obtenido el fragmento deseado, se procede a realizar su purificación en la placa FilterPlates para PCR de 96 micropocillos (Millipore™ MultiScreen®) siguiendo las especificaciones de la casa comercial.

A continuación, se lleva a cabo la cuantificación del producto de PCR purificado en el espectrofotómetro para microplacas Epoch™ (BioTek) y se analiza el resultado con el software para análisis y reducción de datos Gen5™ (BioTek). Con estos datos, se ajusta la concentración de la muestra con H₂O a 30-50 ng/µL.

Una vez ajustada la concentración de la muestra de ADN purificado, se prepara la reacción de secuenciación (Sanger, Nicklen and Coulson, 1977) según los datos aportados en la *Tabla 12* y se programa el termociclador según la *Tabla 13*. Un dato que debe ser tenido en cuenta es que la cantidad de BrilliantDye™ (Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 100rxn, NimaGen) que se utiliza depende de la longitud del fragmento a amplificar. Cuando el fragmento es de una longitud inferior a 500 pb, se añaden 0,35 µL, mientras que si el fragmento supera las 500 pb de longitud, se añaden 0,50 µL a cada muestra. Esto es así debido a que este reactivo es una mezcla de varios elementos, entre los que se encuentran los nucleótidos terminadores de cadena y la enzima necesaria para la reacción.

Reactivo	Volumen
Seq Buffer, 5X (NimaGen)	1 µL
Cebador	1,5 µL
DMSO (Sigma-Aldrich)	0,5 µL
BrilliantDye v3.1 (NimaGen)	0,35 µL
ADN molde	1,5 µL
H ₂ O	2,15 µL

Tabla 12. Reactivos y volúmenes empleados en la reacción de secuenciación de todos los fragmentos.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	3'	1
96°C	10''	
55°C	5''	25
60°C	4'	
4°C	∞	1

Tabla 13. Programa de termociclador empleado en la reacción de secuenciación de todos los fragmentos.

Terminada la reacción de secuenciación, se procede a la precipitación de los ácidos nucleicos con el kit de purificación BigDye XTerminator® (Life Technologies) de acuerdo al protocolo aportado por la casa comercial.

Por último, se procede a la realización de la electroforesis capilar (3130 Genetic Analyzer to 3130xl Genetic Analyzer Upgrade, Applied Biosystem™), obteniéndose una serie de electroferogramas que permiten el análisis de las secuencias obtenidas mediante el software informático ChromasPro (Technelysium). Con este programa se pueden realizar alineamientos de las secuencias de referencia con las secuencias obtenidas. Las secuencias de referencia utilizadas son las proporcionadas por las bases de datos internacionales como *Ensembl Genome Browser* o el *Gen-Bank* del *NCBI*.

Este protocolo de secuenciación Sanger se aplica para el análisis de los genes tradicionalmente ligados a la ELA y la DFT, como son *SOD1*, *TARDBP*, *FUS*, *MAPT*, *GRN*, *VCP* y *SETX*. También se utiliza para confirmar las variantes potencialmente patológicas encontradas por secuenciación masiva en los pacientes, así como para comprobar la posible cosegregación de la variante en los casos de los que se disponga de ADN procedente de otros miembros de la familia. Por último, en caso de obtener una baja cobertura para algún exón mediante alguna de las técnicas de secuenciación masiva aplicadas para cualquiera de los pacientes, también se procede de igual manera.

Los cebadores necesarios se diseñan utilizando el software online *Primer 3* (Untergasser *et al.*, 2012) en base a las secuencias proporcionadas en las bases de datos anteriormente descritas.

3.2 Estudio de la expansión de la repetición en el intrón 1 de *C9orf72*

En el caso del estudio de la presencia de la ER del hexanucleótido GGGGCC en el intrón 1 del gen *C9orf72*, se lleva a cabo una PCR convencional y a veces una triple PCR o *repeat-primed PCR*. Todos los pacientes presentados en esta tesis tienen realizado este estudio con la excepción de muestras de familiares de pacientes positivos para otro gen.

De manera rutinaria se realiza la PCR convencional según las *Tablas 15 y 16*. En el caso de que el análisis del resultado aporte un único pico, hay dos opciones: que los dos alelos porten el mismo número de repeticiones del hexanucleótido o que uno de ellos porte un número enorme de repeticiones y sea imposible de determinar mediante la PCR convencional. Cabe recordar que esta ER tiene la particularidad de tener en algunos casos cientos de repeticiones, por lo que no es tan sencillo detectar las ER como en el caso que tiene lugar en el epígrafe 3.3 *Estudio de la expansión de la repetición en ATXN2*. Los cebadores utilizados en la PCR convencional se ven en la *Tabla 14*.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador
C9ORF F	6-FAM-CAAGGAGGGAAACAACCGCAGCC
C9ORF R	GCAGGCACCGCAACCGCAG

Tabla 14. Secuencia de los cebadores empleados en la PCR convencional (Akimoto *et al.*, 2014).

Reactivo	Volumen
7-deaza-dGTP (Roche) ¹	0,56 µL
Betaína 1X (Sigma-Aldrich)	4,48 µL
DMSO (Sigma-Aldrich)	1,4 µL
MgCl ₂ 0,75 mM (NZYTech)	1,12 µL
Buffer 10X (NZYTech)	2,8 µL
Mix dCTP, dATP, dTTP 1mM (NZYTech)	0,56 µL
Cebador C9ORF F (100 µM) ²	0,056 µL
Cebador C9ORF R (100 µM)	0,056 µL
TaqPolimerasa (NZYTech)	0,14 µL
H ₂ O	15,328 µL
ADN molde (125 ng/ µL)	1,5 µL

Tabla 15. Reactivos y volúmenes empleados en la PCR convencional de *C9orf72*. ¹ Mantener siempre en congelador, añadir el último / ² Mantener siempre alejado de la luz, añadir justo antes de la 7-deaza-dGTP).

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	5'	1
95°C	30"	35
60°C	30"	
72°C	1'	
72°C	5'	
4°C	∞	1

Tabla 16. Programa de termociclador empleado en la PCR convencional de *C9orf72*.

El producto de PCR se diluye 1/2 y se prepara para la electroforesis capilar de la siguiente manera: 0,3 µL de marcador GeneScan 400HD ROX dye Size Standard (Applied Biosystems™), 10 µL de formamida desionizada y 2 µL del producto de PCR diluido. Previamente a la electroforesis capilar, los fragmentos se desnaturalizan durante 3' en un termociclador a 95°C.

Como se ha expresado anteriormente, en el caso de la presencia de un solo pico, se procede a realizar la triple PCR que se explica a continuación.

El método de la triple PCR es un sistema rápido y preciso de separar las muestras que portan la expansión patológica de la repetición (≥ 30 repeticiones) de los que portan el alelo de referencia (≤ 20 repeticiones). Este ensayo de PCR utiliza un cebador flanqueante específico marcado con fluorescencia (P1) junto con un par de cebadores (P2, P3), que comparten una secuencia 5' común

(cola). Los criterios de selección para la secuencia del cebador de anclaje (P2) son que debe contener poca o ninguna complementariedad consigo mismo, no tener complementariedad (GCA)5', (TGC)5' o (GGGGCC)5', y no tener homología con secuencias humanas conocidas. El cebador reverso (P3) tiene la secuencia (GGGGCC)5' en su extremo 3' en función de la hebra de la repetición a amplificar (Tabla 17).

Nombre del cebador	Secuencia del cebador
Cebador con fluorescencia (P1)	6FAM-TGTAAAACGACGGCCAGTCAAGGAGGGAAACAACCGCAGCC
Cebador de anclaje (P2)	CAGGAAACAGCTATGACCGGGGCCCCGCCGACCGCCCCGGCCCCG GCCCCGG
Cebador reverso (P3)	CAGGAAACAGCTATGACC

Tabla 17. Secuencia de los cebadores empleados en la triple PCR (DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011).

La triple-PCR se lleva a cabo de acuerdo con la bibliografía existente (DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011; Kobayashi *et al.*, 2011). En la Tabla 18 se puede ver la preparación de la PCR y en la Tabla 19 el programa el termociclador:

Reactivo	Volumen
7-deaza-dGTP (Roche) ¹	1,411 µL
Betaína 1X (Sigma-Aldrich)	7,84 µL
DMSO (Sigma-Aldrich)	1,96 µL
Cebador P1 (100 µM)	0,314 µL
Cebador P2 (100 µM)	0,314 µL
Cebador P3 (100 µM) ²	0,314 µL
AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Life Technologies)	14 µL
H ₂ O	1,848 µL
ADN molde (125 ng/ µL)	1,5 µL

Tabla 18. Reactivos y volúmenes empleados en la triple-PCR de *C9orf72*. (¹ Mantener siempre en congelador, añadir el último / ² Mantener siempre alejado de la luz, añadir justo antes de la 7-deaza-dGTP).

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	10'	1
97°C	35"	8
64°C	2'	
68°C	8'	
97°C	35"	
64°C	2'	27
68°C	8' (Δ20"/ciclo)	
4°C	∞	
		1

Tabla 19. Programa de termociclador empleado en la triple-PCR de *C9orf72*.

Los productos de PCR se diluyen 1/2 y se preparan para la electroforesis capilar de la siguiente manera: 0,3 µL de marcador GeneScan 400HD ROX dye Size Standard (Applied Biosystems™), 10 µL de formamida desionizada y 3 µL del producto de PCR diluido. Previamente a la electroforesis capilar, los fragmentos se desnaturalizan en un termociclador a 95°C durante 3'.

Finalmente, los resultados se analizan con el programa Peak Scanner™ S.V.(1.0) (Applied Biosystem™), donde se puede ver, en los casos positivos para la ER, un característico patrón de dientes de sierra con una periodicidad de 6 pb (Figura 4).

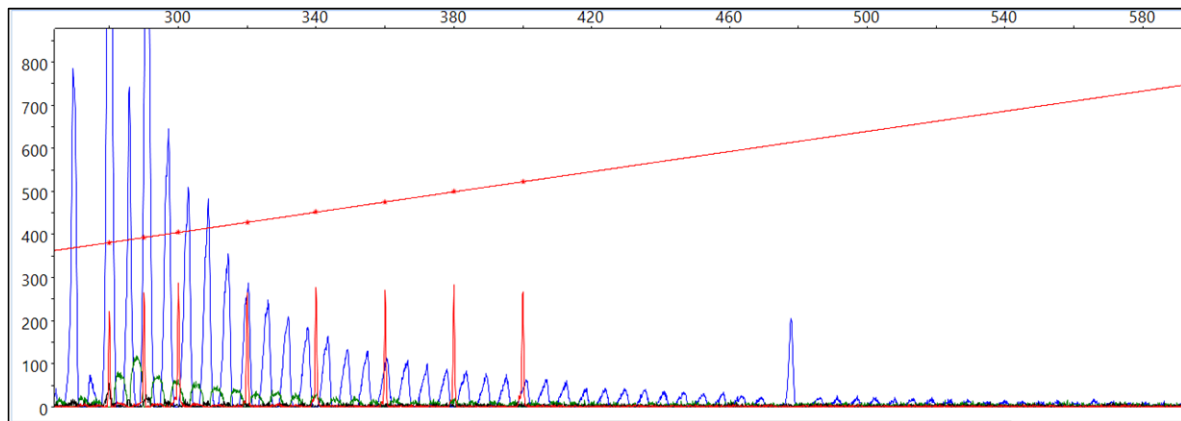


Figura 4. Ejemplo representativo de triple PCR con resultado positivo (GGGGCC >30 repeticiones). Los puntos rojos sobre las líneas rojas indican el tamaño de los marcadores, y el eje vertical representa la intensidad de fluorescencia.

3.3 Estudio de la expansión de la repetición en ATXN2

El estudio que se lleva a cabo en *ATXN2* es la detección de la expansión de una repetición del trinucleótido CAG, conduciendo a la aparición de una poliglutamina en la proteína. El protocolo utilizado fue cedido por el Servicio de Inmunología del Hospital 12 de Octubre, en el cual se especificaba el diseño de cebadores según la *Tabla 20*.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador
SCA2-F	6FAM-CGTGCGAGCCGGTGTATGGG
SCA2-R	GGCCGACGCTAGAAGGCCGCT
AF-P3	TACGCATCCCAGTTTGAGACG
SCA-P4	6FAM-TACGCATCCCAGTTTGAGACGCGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG

Tabla 20. Cebadores empleados en la PCR convencional y en la triple PCR para detectar la expansión poliQ en el gen *ATXN2*.

Para el análisis de esta expansión se procede de igual manera a lo comentado en el epígrafe 3.2 *Estudio de la expansión de la repetición en el intrón 1 de C9orf72*. Se comienza con la PCR convencional (*Tablas 21 y 22*) y si se obtienen dos alelos con diferente número de repeticiones se asume ese resultado.

Reactivo	Volumen
Buffer 10X (Roche)	2,5 µL
dNTPs 1,25 mM (NZYTech)	4 µL
GCRich (Roche)	5 µL
MgCl ₂ (Roche)	1,5 µL
Taq FastStart (Roche) ¹	0,5 µL
DMSO (Sigma-Aldrich)	2,5 µL
H ₂ O	4 µL
Cebador SCA2-F (20mM) ²	1,5 µL
Cebador SCA2-R (20mM)	1,5 µL

Tabla 21. Reactivos y volúmenes empleados en la PCR convencional de *ATXN2*. (¹ Mantener siempre en congelador, añadir el último / ² Mantener siempre alejado de la luz, añadir justo antes de la Taq FastStart).

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	5'	1
97°C	15''	42
53°C	20''	
72°C	1'	
72°C	10'	
4°C	∞	1

Tabla 22. Programa de termociclador empleado en la PCR convencional de *ATXN2*.

En caso de que la técnica muestre un único pico como resultado, queda por despejar la incógnita de si se trata del hecho de que los dos alelos porten el mismo número de repeticiones del trinucleótido, o por el contrario, uno de los alelos tenga una expansión lo suficientemente larga como para que no sea detectada por la PCR convencional. En este caso, la ER en *ATXN2* no tiene grandes expansiones como el caso de *C9orf72*, pero siempre se realiza como seguro. De esta manera, se realizaría la triple PCR de acuerdo a las *Tablas 23 y 24*.

Reactivo	Volumen
Buffer 10X (Roche)	2,5 µL
dNTPs 1,25 mM (NZYTech)	4 µL
GCRich (Roche)	5 µL
MgCl ₂ (Roche)	1,5 µL
Taq FastStart (Roche) ¹	0,4 µL
H ₂ O	1,6 µL
Cebador SCA2-R (20mM)	2 µL
Cebador SCA-P4 (20mM) ²	2 µL
Cebador AF-P3 (20mM)	2 µL

Tabla 23. Reactivos y volúmenes empleados en la triple PCR de *ATXN2*. (¹ Mantener siempre en congelador, añadir el último / ² Mantener siempre alejado de la luz, añadir justo antes de la Taq FastStart).

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	5'	1
94°C	30''	30
60°C	30''	
72°C	30''	
72°C	10'	
4°C	∞	1

Tabla 24. Programa de termociclador empleado en la triple PCR de *ATXN2*.

Los productos de ambas PCR se diluyen 1/10. Y por último, el fragmento se prepara para la electroforesis capilar de la siguiente manera: 1 µL de marcador GeneScan 400HD ROX dye Size Standard (Applied BiosystemsTM), 11 µL de formamida desionizada y 3 µL del producto de PCR diluido. Previamente a la electroforesis capilar, se desnaturaliza en un termociclador a 95°C durante 5'.

Finalmente, los resultados también se analizan utilizando el programa Peak ScannerTM S.V.(1.0) (Applied BiosystemTM), donde se puede ver un patrón similar al que se encuentra en la *Figura 5*, pero con una periodicidad de 3 pb.

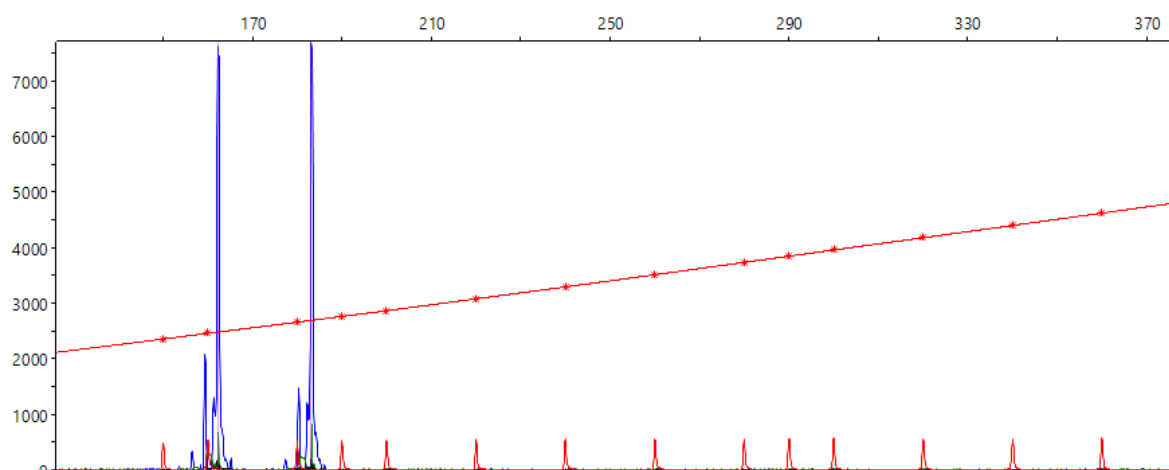


Figura 5. Ejemplo representativo de PCR convencional con resultado de expansión intermedia (23-30 repeticiones). Los dos picos representan los dos alelos. Los puntos rojos sobre las líneas rojas indican el tamaño de los marcadores, y el eje vertical representa la intensidad de fluorescencia.

3.4 Panel génico personalizado

Como primera aproximación de NGS utilizada se opta por la secuenciación masiva dirigida a través del diseño y puesta a punto de un panel génico que permitiera una secuenciación costo-efectiva de una batería amplia de genes relacionados con la ELA y la DFT (Tabla 25).

<i>ALS2</i>	<i>ANG</i>	<i>ANXA11</i>	<i>AR</i>	<i>ATRN</i>	<i>ATXN2</i>	<i>C9orf72</i>
<i>CCNF</i>	<i>CHCHD10</i>	<i>CHGB</i>	<i>CHMP2B</i>	<i>DAO</i>	<i>DCTN1</i>	<i>EPB41L1</i>
<i>EPHA4</i>	<i>EWSR1</i>	<i>FIG4</i>	<i>FLNC</i>	<i>FUS</i>	<i>GRN</i>	<i>HNRNPA1</i>
<i>HNRNPA2B1</i>	<i>KIF5A</i>	<i>MAPT</i>	<i>MATR3</i>	<i>NEFH</i>	<i>NEK1</i>	<i>OPTN</i>
<i>PFN1</i>	<i>PRPH</i>	<i>PSEN1</i>	<i>SETX</i>	<i>SIGMAR1</i>	<i>SOD1</i>	<i>SPAST</i>
<i>SPG11</i>	<i>SPG7</i>	<i>SQSTM1</i>	<i>STX12</i>	<i>TAF15</i>	<i>TARDBP</i>	<i>TBK1</i>
<i>TUBA4A</i>	<i>UBQLN2</i>	<i>UNC13A</i>	<i>VAPB</i>	<i>VCP</i>	<i>VEGFA</i>	

Tabla 25. Genes seleccionados para el diseño del panel génico personalizado.

Se seleccionaron 103 pacientes con ELA y/o DFT tanto esporádica como familiar (Tabla 26). Entre los pacientes, se incluyó 1 con mutación previamente hallada (Paciente 255), 19 pacientes con ELA que tenían previamente secuenciado el gen *SOD1* (sin resultado positivo) y además, otros 2 pacientes cuyos familiares portaban una mutación probablemente patogénica y de los que se solicitó un estudio familiar más completo para la publicación de los resultados (Pacientes 153 y 1838). El paciente 1838 no se contabiliza en ningún momento ya que no es considerado caso índice. Todos estos sirvieron a modo de control positivo y negativo respectivamente.

Cabe destacar que dentro de la distinción de los pacientes de ELA y DFT hay que crear un grupo intermedio ELA-DFT, que es simplemente una selección de los pacientes que pertenecen a los grupos de ELA y DFT pero que han llegado a padecer la otra enfermedad también, o pacientes con ELA y DFT con historia familiar positiva de la enfermedad contrapuesta. En resultados, este grupo tendrá un peso específico, de ahí su puntualización. Este grupo engloba concretamente a 20 pacientes.

	ELA	DFT
Esporádica	42	39
Familiar	19	3

Tabla 26. Resumen de la clínica de los pacientes estudiados por panel génico. Clasificación estrictamente utilizada. Solo serán ELAf los que tengan un caso en primer o segundo grado de ELA, de igual manera se procede con DFT. De ahí que posteriormente estos números puedan ser ligeramente modificados con la inclusión de familiares con la otra patología.

Se utilizó la tecnología basada en amplicones TruSeq Custom Amplicon v2 (TSCA, Illumina®) de acuerdo a los protocolos del fabricante. La cobertura media elegida fue de 300X para asegurarnos una cobertura mínima media de 100X. Los cebadores para el panel personalizado fueron diseñados con Design Studio (Illumina®), para asegurarnos cubrir todas las regiones codificantes de los exones, las regiones UTR (5' y 3') y además incluir sitios de flanqueamiento intrónico de 25 pb con el fin de cubrir zonas de corte y empalme del ARN (*splicing*) adyacentes.

La longitud del amplicón promedio fue de 250 pb. Se evitaban polimorfismos en el diseño de los cebadores. La secuenciación se realizó utilizando el kit de reactivos y el cartucho MiSeq Reagent Kit v2, utilizando 500 ciclos de lectura de extremo pareado 2x250 en la plataforma MiSeq (Illumina®). Los datos fueron analizados automáticamente por el software MiSeq Reporter (Illumina®) presente en el instrumento. La alineación se realizó contra el genoma de referencia humana GRCh37 / Hg19. Por último, los archivos VCF se anotaron mediante el software libre ANNOVAR (Wang, Li and Hakonarson, 2010).

Como datos de calidad de la secuenciación realizada por este método, se obtuvo un Q30 \geq 94,3 de media, así como una cobertura 150X del 91,8%. Si bien es cierto que hubo regiones más propensas a tener coberturas inferiores a 20X como el final del exón 5 y principio de la región 3'UTR del gen SOD1, por lo que se les realizó secuenciación Sanger.

Además, se construyó una base de datos con el conjunto de variantes encontradas en cada paciente y en cuántas ocasiones eran visualizadas. De esta manera, se eliminaron un número importante de variantes clasificadas como VUS (variante de significado incierto) dada su alta aparición en nuestra cohorte.

Todas las variantes detectadas se filtraron de acuerdo con el siguiente esquema:

1. Eliminar variantes con $MAF < 0,01$ en las bases de datos GnomAD, 1000Genomes y ExAC
2. Priorizar variantes en las regiones codificantes y de corte y empalme
3. Eliminar variantes sinónimas que no afectan al corte y empalme
4. Predicción *in silico* (PolyPhen2, SIFT, MutationTaster, M-CAP, CADD)
5. Evaluar el fenotipo y modo de herencia en los casos familiares

En los casos en los que se encontraban variantes consideradas patogénicas o probablemente patogénicas, se procedió a su validación mediante secuenciación Sanger, y en los casos en los que fuera posible, el análisis de cosegregación.

3.5 Secuenciación del exoma completo (WES)

Como siguiente aproximación se opta por la secuenciación exómica (WES) y el análisis de una cantidad de genes muy superior a la analizada mediante el método del panel génico personalizado.

Se distinguen las posibles mejoras a la hora de la selección de los genes de interés, y se hace especial hincapié en reforzar la selección de genes con mayor relación con la DFT en el espectro sindrómico ELA-DFT, incluyéndose además los genes relacionados con la EA. También se incluyen los principales genes de la EP, paraparesias, CMT, AME y algunos de nuevo descubrimiento. Para que se pueda visualizar de manera más clara la diferencia en el número de genes empleados, se señalan en azul en la *Tabla 27* los genes que estaban incluidos en el panel génico.

AAAS	AARS	ABCD1	ADAR	ADCY5	AHNAK2	ALDH18A1
ALS2	AMPD2	ANG	ANO3	ANXA11	AP4B1	AP4E1
AP4M1	AP4S1	AP5Z1	APOE	APP	AR	ARL6IP1
ARRP21	ARSA	ARSI	ATL1	ATM	ATP13A2	ATP1A1
ATP1A3	ATP7B	ATRN	ATSV	ATXN2	B4GALNT1	BAG3
BCAP31	BICD2	BSCL2	C12orf65	C19orf12	C21orf2	C9orf72
CACNA1B	CAPRIN1	CCNF	CCT5	CHCHD10	CHCHD2	CHGB
CHMP2B	CIZ1	COL6A3	CPT1C	CYP2U1	CYP7B1	DAO
DCAF17	DCAF8	DCTN1	DDC	DDHD1	DDHD2	DGAT2
DHTKD1	DNAJB2	DNAJC6	DNM2	DNMT1	DYNC1H1	EGR2
ELP3	ENTPD1	EPB41L1	EPHA4	ERBB4	ERLIN1	ERLIN2
EWSR1	EXOSC3	FA2H	FBXO38	FBXO7	FIG4	FLNC
FTL	FUS	GAN	GARS	GBA2	GCDH	GCH1
GDAP1	GGNBP2	GJA1	GJB3	GNAL	GPX3	GRN
GSN	HARS	HEXA	HINT1	HMSN5	HNRNPA1	HNRNPA2B1
HPCA	HSPB1	HSPB3	HSPB8	HSD1	HTRA2	HTT
IBA57	IFRD1	IGHMBP2	KCC3	KCNMA1	KCTD17	KDM5C
KIF1A	KIF1B	KIF1C	KIF5A	L1CAM	LMNA	LRRK2
LRSAM1	MAG	MAPT	MARS	MATR3	MCM3AP	MED25
MFN2	MME	MOBP	MORC2	MPV17	NAGLU	NEFH
NEFL	NEK1	NIPA1	NT5C2	OPTN	PANK2	PARK10
PARK11	PARK12	PARK2	PARK7	PFN1	PGAP1	PINK1
PLA2G6	PLP1	PNKD	PNKP	PNPLA6	POLG	PRKN
PRKRA	PRPN	PRPH	PRRT2	PSEN1	PSEN2	RAB3GAP2
RAB7A	RAB8A	REEP1	REEP2	RELN	RTN2	SACS
SARM1	SCFD1	SCO2	SCYL1	SETX	SGCE	SGPL1
SIGMAR1	SLC16A2	SLC19A3	SLC25A46	SLC2A1	SLC33A1	SLC5A7
SCL6A3	SCL9A8	SMN1	SMN2	SNCA	SOD1	SORT1
SPART	SPAST	SPG11	SPG21	SPG7	SPR	SPTLC1
SPTLC2	SPTLC3	SQSTM1	STX12	TAF1	TAF15	TARDBP
TBCK	TBK1	TECP2	TFG	TH	THAP1	TIMM8A
TMEM106B	TNIP1	TOR1A	TREM2	TRIM2	TRPV4	TUBA4A
TUBB3	TUBB4A	UBQLN2	UNC13A	USP8	VAMP1	VAPB
VCP	VEGFA	VPS13A	VPS35	VPS37A	WARS	WASHC5
ZFR	ZFYVE26	ZFYVE27				

Tabla 27. Genes seleccionados para el estudio de los pacientes a los que se les realiza secuenciación exómica.

Los 114 pacientes seleccionados se clasifican según la *Tabla 28*. Hay 107 pacientes pertenecientes a los 1336 casos índice, 6 son familiares afectados y 1 es familiar asintomático. De igual manera a lo que sucede en el panel génico, también hay que tener en cuenta el grupo ELA-DFT que consta de 39 pacientes (de los cuales 9 están previamente diagnosticados molecularmente). También hay que suscribir que aquí están incluidos los pacientes a los que se les hizo el WES para el epígrafe 3.5 *Demostración del posible origen somático de la ELA*.

		Pacientes	Oligogenia
ELA	ELAe	60	12
	ELAf	29	16
DFT	DFTe	17	1
	DFTf	7	3
Asintomático		1	1
Total		114	33

Tabla 28. Resumen de la clínica de los pacientes estudiados por WES.

Entre los pacientes, se incluyeron 32 pacientes y un familiar asintomático con diagnóstico molecular previo que permiten intentar comprobar el papel de la oligogenia en el grupo de estudio. Todos los pacientes a los que se les realiza secuenciación masiva son incluidos en el análisis de la oligogenia, pero esta selección de 32 pacientes con una mutación hallada previamente (*Tabla 29*), puede facilitar la posibilidad de estudiar su papel. Además, todos estos pacientes son utilizados como control positivo interno de la secuenciación del exoma.

Gen	Mutación	Pacientes
<i>C9orf72</i>	ER GGGGCC > 30	136, 407, 622, 776, 1105, 1132, 1312, 1405 ¹ , 1428, 1434, 1466, 1633, 1643 ² , 1736 ²
<i>SOD1</i>	p.K3E	446
	p.N19S	309
	p.Q21G	484
	p.Q22L	508
	p.N65S	161, 1431, 2074
	p.D90A	800
	p.D90A ^{HOMO}	121
	p.L106V	1824
	p.I112T	2094
	p.I113T	1241
	p.L117V	1775 ²
	p.L126fsX7	2165
<i>TARDBP</i>	p.G295S	2109
<i>FUS</i>	p.P525L	2157
<i>SETX</i>	p.K598R	323
<i>SQSTM1 + TBK1</i>	p.P392L + p.N254fsX4	1066
<i>CCNF</i>	p.S195R	841

Tabla 29. Pacientes incluidos en la secuenciación exómica con mutación previamente descrita en el Laboratorio de Investigación en ELA o en colaboración con otros proyectos a nivel nacional e internacional. ¹ es el familiar asintomático de un caso índice, ² son familiares afectados de casos índice. ^{HOMO} homocigosis en el paciente

Para el WES se utilizó la tecnología de captura SureSelect^{XT} Human All Exon V6 (Agilent) de acuerdo a los protocolos del fabricante. La cobertura mínima media se estableció en 100X, además en el diseño se incluyó las regiones UTR (5' y 3' UTR) y otras 25 pb de zonas de flanqueamiento intrónico que pudieran portar variantes de corte y empalme.

La secuenciación se realizó con lecturas de longitud 150 pb de extremo pareado 2x150 en la plataforma NovaSeq 6000 (Illumina®), obteniendo como mínimo 12 GB de información por muestra con los archivos FastQ. Se utilizó el software BWA (Li and Durbin, 2010) para asignar las lecturas de secuenciación al genoma de referencia GRCh37 / Hg19 y obtener los BAM, y el software SAMtools (Li *et al.*, 2009) para ordenar los BAM. Después, se utilizó la herramienta GATK para unir los archivos BAM de la misma muestra y marcar las lecturas duplicadas, y a su vez para detectar y filtrar SNPs e INDELS. Por último, se utilizó el software ANNOVAR para la anotación de variantes (Wang, Li and Hakonarson, 2010).

Los datos de calidad de la secuenciación exómica fueron de un $Q30 \geq 91,4\%$ de media, y unas coberturas medias de 50X (89,5%) y 20X (98,9%). En este caso solo se tienen en cuenta las secuenciaciones provenientes de ADN extraído de sangre puesto que las secuenciaciones de ADN de tejidos (ver epígrafe 3.5 *Demostración del posible origen somático de la ELA*) no se utilizan en el análisis general de los pacientes.

Todas las variantes detectadas se filtraron de acuerdo con el siguiente esquema:

1. Selección del paquete de los 241 genes expuestos en la *Tabla 27*.
2. Eliminar variantes con $MAF < 0,01$ en las bases de datos de 1000Genomes y de ExAC
3. Priorizar variantes en las regiones codificantes o de corte y empalme
4. Eliminar variantes sinónimas que no afectan al corte y empalme
5. Predicción in silico (PolyPhen2, SIFT, MutationTaster, M-CAP, CADD)
6. Evaluar el fenotipo y modo de herencia en los casos familiares

En los casos en los que se encontraban variantes consideradas patogénicas o probablemente patogénicas, se procedió a su validación mediante secuenciación Sanger, y en los casos en los que fuera posible, el análisis de cosegregación.

3.5 Demostración del posible origen somático de la ELA

Para este objetivo se utiliza la secuenciación del exoma completo (WES) de 3 tejidos de 27 pacientes. Partiendo de la hipótesis de que las mutaciones en los tejidos tienen lugar durante etapas tempranas de la embriogénesis, se tratan los datos de los exomas como germinales, procedentes de diferentes capas embrionarias.

La elección de estos pacientes se debe exclusivamente a la posibilidad de tener acceso a los tejidos congelados de necropsias de los mismos (Fundación CIEN) así como de la disponibilidad de ADN extraído de sangre en el Laboratorio de Investigación en ELA (*Tabla 30*).

Código	Sexo	Clínica	Edad de inicio	Lugar de inicio	Forma de inicio	Alteración cognitiva	Mutación
161	Mujer	ELAe	43	Espinal	NMI	No	<i>SOD1</i> (p.N65S)
216	Mujer	ELAe	44	Bulbar	NMI	n.d.	-
243	Hombre	ELAe	51	Bulbar	n.d.	No	-
323	Hombre	ELA-DFTe	39	Espinal	NMS+NMI	Algún rasgo	<i>SETX</i> (p.K598R)
467	Mujer	ELAe	61	Bulbar	NMS+NMI	No	-
622	Hombre	ELA-DFTf	67	Espinal	NMS+NMI	Algún rasgo	ER <i>C9orf72</i>
655	Hombre	ELAe	58	Espinal	n.d.	No	-
664	Mujer	ELAe	65	Espinal	n.d.	No	-
685	Mujer	ELA-DFTe	56	Espinal	NMS+NMI	Algún rasgo	-
716	Hombre	ELAe	66	Espinal	n.d.	No	-
752	Mujer	ELAe	61	Bulbar	NMS	No	-
815	Mujer	ELAe	77	Espinal	n.d.	No	-
841	Mujer	ELAf	54	Espinal	n.d.	No	<i>CCNF</i> (p.S195R)
849	Mujer	ELAe	77	Bulbar	n.d.	No	-
990	Hombre	ELAe	51	Espinal	NMI	No	-
1033	Hombre	ELAe	70	Espinal	n.d.	No	-
1050	Mujer	ELAe	55	Espinal	n.d.	No	-
1066	Hombre	ELA-DFTe	48	Espinal	NMS	ANFP	<i>SQSTM1</i> p.P392L + <i>TBK1</i> p.N254fsX4
1105	Mujer	ELAe	71	Espinal	NMI	No	ER <i>C9orf72</i>
1133	Mujer	ELAe	79	Bulbar	NMS+NMI	No	-
1138	Mujer	ELAe	79	Espinal	NMS+NMI	No	-
1496	Mujer	ELAe	45	Espinal	n.d.	n.d.	-
1505	Hombre	ELAf	74	Bulbar	NMI	No	-
1616	Hombre	ELAe	56	n.d.	NMS+NMI	No	-
1664	Mujer	ELAe	77	Bulbar	NMI	No	-
1789	Hombre	ELAe	54	Espinal	NMI	No	-
1815	Mujer	ELAe	77	Espinal	NMS	No	-

Tabla 30. Características de los pacientes utilizados en el estudio del origen somático. NMS (inicio en neurona motora superior), NMI (inicio en neurona motora inferior) y NMS+NMI (inicio con ambos tipos de neurona motoras implicadas); n.d. significa “no disponible”.

A su vez, los tejidos seleccionados de las necropsias deben ser iguales en todos los pacientes para evitar posibles variabilidades internas en el estudio. De esta manera, se apuesta por la utilización de ADN procedente de médula espinal cervical (ME) como tejido afecto y de hemisferio cerebeloso (HC) como tejido no afecto en pacientes con ELA, ambos tejidos del ectodermo. Por último, también utilizado como tejido no afecto y como referencia de otra capa embrionaria (mesodermo), se utiliza el ADN procedente de la sangre.

La secuenciación del exoma y el análisis primario desde el FastQ hasta el BAM se realizan de igual manera a la descrita en el epígrafe 3.5 *Secuenciación del exoma completo (WES)*. La secuenciación del exoma en tejidos puede requerir del método “Low-input” en caso de encontrarse una concentración <15 ng/uL, como fue el caso de las muestras de ME de los pacientes 716, 664, 815, 849, 990, 1496 y 1616; y de las muestras de HC de los pacientes 467 y 1789.

El 90,19% de las secuencias de los tejidos tienen una calidad de secuenciación Q30 o superior. Otros datos de interés sobre la calidad de la secuenciación son la cobertura 50X (87,5%) y la cobertura 20X (98,6%).

Como comienzo del análisis, se comprobó la presencia en ME y HC de las variantes previamente encontradas mediante secuenciación Sanger en las sangres, a modo de controles internos.

Análisis 1: Comparación numérica intertejidos. Para comenzar el estudio comparativo entre tejidos, se buscó una diferencia numérica de variantes raras ($MAF < 0,01$) entre los 3 tejidos para cada uno de los genes ELA-DFT analizados (*Tabla 31*), así como analizar esas posibles diferencias.

Análisis 2: Presencia de variantes comunes. Otra de las opciones analizadas es la presencia de variantes muy comunes en ME (presente en al menos 20 de las 27 ME) y que no se encontraran en más de 5 HC y/o 5 sangres. Por lo tanto, aquí no se realiza ningún tipo de filtrado por frecuencia poblacional de las variantes poblacionales, pues los que se pretende es diferenciar patrones de aparición de cambios puntuales en el ADN.

Análisis 3: Diferencias intraindividuo. A su vez, existe la posibilidad de que haya cambios puntuales que se enmascaren durante este análisis por la existencia de variantes en la ME de un paciente y esa misma variante estuviera presente en otro tejido distinto de otro de los pacientes. Para evitar este problema, se realizaron 2 tipos de análisis adicionales de concordancia:

- Análisis 3.1. Se realiza el análisis de los tres tejidos por cada individuo, buscando la presencia de variantes raras ($MAF < 0,01$) en la ME que no estuviera en el HC o en la sangre.
- Análisis 3.2. El último de los análisis y menos restrictivo a la hora de encontrar cualquier diferencia fue la realización de la comparación de los tejidos de un mismo individuo con 2 nuevos parámetros de inclusión de variantes: Se priorizan aquellas homocigotas en ME que sean heterocigotas en el conjunto de HC y sangre; y las que por el contrario se genotipan como heterocigotas en ME y resultan homocigotas para la secuencia de referencia en el conjunto de HC y sangre.

Para los análisis 1, 2 y 3.1, que se realizaron en paralelo, se comenzó con el estudio de los genes presentes en el panel génico añadiendo varios nuevos genes como se puede ver en la *Tabla 31*:

<i>ALS2</i>	<i>ANG</i>	<i>ANXA11</i>	<i>AR</i>	<i>ARRP21</i>	<i>ATRN</i>	<i>ATXN2</i>
<i>C9orf72</i>	<i>CAPRIN1</i>	<i>CCNF</i>	<i>CHCHD10</i>	<i>CHGB</i>	<i>CHMP2B</i>	<i>DAO</i>
<i>DCTN1</i>	<i>EPB41L1</i>	<i>EPHA4</i>	<i>ERBB4</i>	<i>EWSR1</i>	<i>FIG4</i>	<i>FLNC</i>
<i>FUS</i>	<i>GGNBP2</i>	<i>GPX3</i>	<i>GRN</i>	<i>HNRNPA1</i>	<i>HNRNPA2B1</i>	<i>KIF5A</i>
<i>MAPT</i>	<i>MATR3</i>	<i>MOBP</i>	<i>NEFH</i>	<i>NEK1</i>	<i>OPTN</i>	<i>PFN1</i>
<i>PRPH</i>	<i>PSEN1</i>	<i>PSEN2</i>	<i>SARM1</i>	<i>SCFD1</i>	<i>SETX</i>	<i>SIGMAR1</i>
<i>SLC9A8</i>	<i>SOD1</i>	<i>SPAST</i>	<i>SPG11</i>	<i>SPG7</i>	<i>SPTLC1</i>	<i>SQSTM1</i>
<i>STX12</i>	<i>TAF15</i>	<i>TARDBP</i>	<i>TBK1</i>	<i>TNIP1</i>	<i>TREM2</i>	<i>TUBA4A</i>
<i>UBQLN2</i>	<i>UNC13A</i>	<i>VAPB</i>	<i>VCP</i>	<i>VEGFA</i>		

Tabla 31. Genes ELA-DFT empleados como primera opción de análisis. En negrita se resaltan los genes que no estaban incluidos en el panel génico.

Cuando se realizaron los análisis teniendo en cuenta los genes de la *Tabla 31*, se tuvieron también en cuenta los INDELS. En el análisis posterior, con mayor número de genes, y dada la cantidad de artefactos, se optó por descartarlos.

Se repitieron los análisis 2 y 3, continuando con el estudio de un abanico más amplio de genes (*Tabla 27*) entre los que además de los anteriores, se incluían genes de otras enfermedades neurodegenerativas como EA, EP, CMT, PSP, y otras enfermedades neuromusculares.

Por último, se realizó el análisis 4, con los resultados brutos del exoma, sin efectuar ninguna selección de genes.

El procesamiento de los resultados del WES desde la obtención del BAM en adelante se realizó de la siguiente forma para el análisis 3.2 con las siguientes modificaciones:

- Se utilizó el módulo HaplotypeCaller de GATK 3.8.1 para convertir el archivo BAM en un archivo gVCF que aporta todas las posiciones genómicas secuenciadas y si tienen o no variante, a diferencia de un VCF que solo indica las posiciones con variante.
- Después, se unificaron todos los gVCF mediante el módulo GenotypeGVCFs de GATK.
- Se seleccionaron las variantes (VariantFiltration de GATK) para la selección de SNPs basándonos en los criterios de buenas prácticas recomendados por GATK.
- Mediante GATK (CalculateGenotypePosteriors) se calcularon los genotipos y se filtraron aquellas variantes cuya GQ (calidad de genotipado) fuera <20 (VariantFiltration, GATK), de esta manera se intentan mantener las regiones bien genotipadas.
- Por último, se procedió a la anotación de variantes mediante el software ANNOVAR (Wang, Li and Hakonarson, 2010).

Para el análisis 3.2, se procedió al análisis de variantes de la siguiente manera:

1. Se seleccionan variantes exónicas, de *splicing*, UTR, *downstream* y *upstream*. Se ha considerado *splicing* a todas aquellas variantes en la región flanqueante ± 15 pb de los exones.

2. Se descartan las variantes clasificadas como benignas o probablemente benignas por Intervar (Clasificador automático de variantes según los criterios de ACMG y AMP (Li and Wang, 2017)).
3. Por último, se realiza un filtrado por frecuencias de población ($<0,01$) según las siguientes base de datos:
 - a. 1000g2015aug_all
 - b. gnomAD_exome_all
 - c. gnomAD_genome_all
 - d. ExAC_all

Todas las posibles diferencias encontradas, en cualquiera de los análisis, se visualizan a través de IGV (Thorvaldsdóttir, Robinson and Mesirov, 2013) para comprobar si se trata de variantes reales o artefactos de la secuenciación.

4. CLASIFICACIÓN DE VARIANTES

Las variantes identificadas se clasifican según 4 categorías:

Categoría 1. Variantes asociadas a la ELA que no se encuentran en la base de datos poblacionales de variación genética.

Categoría 2. Variantes asociadas previamente a la ELA y/o DFT que están presentes en las bases de datos de la población.

Categoría 3. Variantes nuevas, es decir, ausentes en pacientes con ELA y/o DFT y en las bases de datos de la población.

Categoría 4. Variantes raras ($MAF < 0,001$) en las bases de datos de población.

Los algoritmos de predicción de patogenicidad no se utilizaron para la asignación de categoría, aunque sí se tuvieron en cuenta para la inclusión definitiva en la Categoría 4. Las cuatro categorías de variantes se consideraron como mutaciones potencialmente patogénicas. La categoría 1 será definida como “*Patogénica*”, la categoría 2 como “*Probablemente patogénica*” y las categorías 3 y 4 quedarán englobadas como “*Variantes de significado incierto (VUS – Variant of Uncertain Significance)*”. Un caso excepcional serán las variantes pertenecientes a la Categoría 3 con un mecanismo patogénico ya descrito.



Resultados

1. VALORACIÓN DE LA EXPANSIÓN DE LA REPETICIÓN DE TRINUCLEÓTIDOS EN EL GEN AR COMO FACTOR DE RIESGO DE ELA Y/O DFT

Para valorar si la expansión de la repetición (ER) de trinucleótidos en el gen AR puede considerarse como un factor de riesgo para la ELA y/o DFT se realizó su estudio en un total de 385 pacientes y 73 controles. Se analizaron 323 ELA, de los cuales 230 son esporádicos y 103 familiares, y 62 DFT, siendo 49 esporádicos y 13 familiares. El grupo ELA-DFT quedaría conformado por 37 sujetos, de ahí que se incluyesen en el grupo correspondiente dependiendo de la clínica inicial. Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 6*.

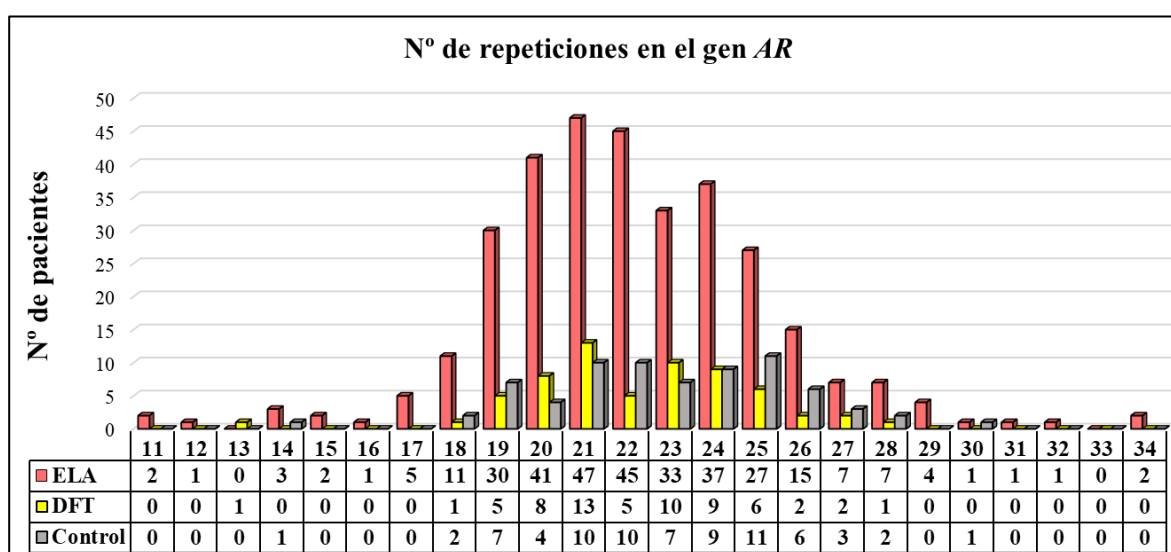


Figura 6. Representación del número de pacientes portadores de diferentes longitudes en la ER del gen AR, así como de casos control. Se describe el número de pacientes por grupo desde 11 hasta 34 repeticiones.

Se observa la presencia de 4 pacientes con ELA (1,24%) en el rango de 31-34 repeticiones, mientras que no hay ningún control que supere las 30 repeticiones. Por otra parte, el grupo DFT no muestra ningún tipo de expansión por encima de las 28 repeticiones. Dos de los 4 pacientes en el rango 31-34 son ELAe (1,74%), uno presenta comorbilidad ELA-DFT (2,7%) (con HFP de ELAf) y el cuarto, es una ELAf (1,94%).

Para evaluar la relación de dependencia entre la ELA y la presencia de expansión (> 30 repeticiones), se realiza una tabla de contingencia (Test exacto de Fisher - F_{ext}) obteniendo una relación no significativa ($p > 0,05$) entre los grupos ELA y control con > 30 repeticiones.

2. DEMOSTRACIÓN DEL POSIBLE ORIGEN SOMÁTICO DE LA ELA

Con el fin de comprobar si la ELA tiene un origen germinal o en cambio tiene algún grado de origen genético somático se realizó la secuenciación del exoma completo (WES) de 3 tejidos de 27 pacientes (21 ELAe, 1 ELAf y 4 ELA-DFT). Las 4 ELA-DFT fueron inicialmente ELA y

posteriormente desarrollan sintomatología de DFT, siendo tres esporádicas y una familiar. La edad de inicio de los casos se encuentra entre 39 y 79 años.

Para comenzar, se verificó la presencia de las variantes anteriormente encontradas mediante estudios previos: *SOD1* (p.N65S), *SETX* (p.K598R), *CCNF* (p.S195R), *SQSTM1* (p.P392L) + *TBK1* (p.N254fsX4) en los 3 tejidos de cada paciente, a modo de control interno.

La comparación numérica intertejidos (Análisis 1) en el que se intentó encontrar un número diferente de variantes raras (MAF < 0,01) para los genes de la *Tabla 32* de “Material y Métodos”, se obtuvieron los siguientes resultados:

NÚMERO DE VARIANTES RARAS (MAF < 0,01)														
GENES	N° de SNPs			N° de INDELS			GENES	N° de SNPs			N° de INDELS			
	ME	HC	S	ME	HC	S		ME	HC	S	ME	HC	S	
<i>ALS2</i>	2	2	2	-	-	-	<i>MOBP</i>	-	-	-	-	-	-	
<i>ANG</i>	1	1	1	-	-	-	<i>NEFH</i>	2	2	2	1	1	1	
<i>ANXA11</i>	2	2	2	-	-	-	<i>NEK1</i>	-	-	-	-	-	-	
<i>AR</i>	2	2	2	-	-	-	<i>OPTN</i>	-	-	-	-	-	-	
<i>ARRP21</i>	-	-	-	-	-	-	<i>PFN1</i>	1	1	1	-	-	-	
<i>ATRN</i>	1	1	1	-	-	-	<i>PRPH</i>	-	-	-	-	-	-	
<i>ATXN2</i>	3	3	3	-	-	-	<i>PSEN1</i>	2	2	2	-	-	-	
<i>C9orf72</i>	1	1	1	-	-	-	<i>SARM1</i>	1	1	1	3	3	3	
<i>CAPRIN1</i>	-	-	-	-	-	-	<i>SCFD1</i>	3	3	3	-	-	-	
<i>CCNF</i>	1	1	1	-	-	-	<i>SETX</i>	3	3	3	-	-	-	
<i>CHCHD10</i>	-	-	-	-	-	-	<i>SIGMAR1</i>	1	1	-	-	-	-	
<i>CHGB</i>	2	2	2	-	-	-	<i>SLC9A8</i>	-	-	-	-	-	-	
<i>CHMP2B</i>	-	-	-	-	-	-	<i>SOD1</i>	2	2	2	-	-	-	
<i>DAO</i>	-	-	-	-	-	-	<i>SPAST</i>	1	1	1	-	-	-	
<i>DCTN1</i>	2	2	2	-	-	-	<i>SPG11</i>	4	4	4	-	-	-	
<i>EPB41L1</i>	1	1	1	-	-	-	<i>SPG7</i>	1	1	1	-	-	-	
<i>EPHA4</i>	1	1	1	-	-	-	<i>SPTLC1</i>	2	2	2	-	-	-	
<i>ERBB4</i>	-	-	-	-	-	-	<i>SQSTM1</i>	2*	2*	4	-	-	-	
<i>EWSR1</i>	-	-	-	-	-	-	<i>STX12</i>	-	-	-	-	-	-	
<i>FIG4</i>	-	-	-	-	-	-	<i>TAF15</i>	2	2	2	-	-	-	
<i>FLNC</i>	3	3	3	-	-	-	<i>TARDBP</i>	-	-	-	-	-	-	
<i>FUS</i>	2	2	2	1	1	1	<i>TBK1</i>	1	1	1	.*	.*	1	
<i>GGNBP2</i>	-	-	-	-	-	-	<i>TNIP1</i>	2	2	2	-	-	-	
<i>GPX3</i>	-	-	-	-	-	-	<i>TREM2</i>	-	-	-	-	-	-	
<i>GRN</i>	1	1	1	-	-	-	<i>TUBA4A</i>	-	-	-	-	-	-	
<i>HNRNPA1</i>	-	-	-	-	-	-	<i>UBQLN2</i>	-	-	-	-	-	-	
<i>HNRNPA2B1</i>	-	-	-	-	-	-	<i>UNC13A</i>	3	3	3	-	-	-	
<i>KIF5A</i>	1	1	1	-	-	-	<i>VAPB</i>	1	1	1	1	1	1	
<i>MAPT</i>	-	-	-	-	-	-	<i>VCP</i>	-	-	-	-	-	-	
<i>MATR3</i>	-	-	-	-	-	-	<i>VEGFA</i>	-	-	-	-	-	-	
TOTAL								60	60	62	6	6	7	

Tabla 32. Número de SNPs encontrados en los genes analizados como primera opción. ME (Médula espinal), HC (Hemisferio cerebeloso), S (Sangre). * indica que esa zona poseía una cobertura <10 lecturas en esos tejidos.

Las diferencias a priori encontradas (*) se deben a la falta de cobertura en determinadas zonas genómicas en los tejidos, probablemente debido al propio origen de dicho ADN (Low-input). Los INDELS en *AR* y *ATXN2* se eliminaron ya que todos se encontraban en la zona de repetición de trinucleótidos.

También se contabilizó el número de variantes del exoma completo sin filtrar por frecuencia poblacional, presentes en los conjuntos de ME, HC y sangre (Tabla 33). Se hizo recuento de la cantidad total de SNPs e INDELS, de los SNPs e INDELS que sólo estaban presentes en 1 de las muestras (únicas) dentro del conjunto de un tejido, y de los SNPs e INDELS que estuviesen presentes en las 27 muestras dentro un mismo tejido (100%).

			TEJIDO		
			ME	HC	S
VARIANTES	SNPs	Cantidad total	114.670	114.670	113.990
		Únicas	41.946	41.946	41.066
		100%	5.186	5.186	5.267
	INDELS	Cantidad total	12.422	12.422	12.151
		Únicas	4.425	4.425	4.199
		100%	464	464	476

Tabla 33. Número de variantes SNPs e INDELS en los conjuntos de ME (médula espinal), HC (hemisferio cerebeloso) y S (Sangre) en el exoma completo. “Cantidad total” indica el número de variantes encontradas en cada conjunto de tejidos; “únicas” indica el número de variantes que aparecen únicamente en una de las muestras de dicho tejido; “100%” indica la cantidad de variantes encontradas en las 27 muestras de ese tejido.

Las diferencias halladas probablemente respondían a la falta de calidad de secuenciación en regiones genómicas de difícil secuenciación (secuencias ricas en un nucleótido, secuencias repetitivas como en los genes *SARM1*, *ATXN2*, *AR...*), y a las propias limitaciones de la técnica.

El análisis 2 (Presencia de variantes comunes) no demostró solamente la presencia de que las variantes que se encontraban en >90% de las ME estaban también presentes en > 10% del HC y > 10% de la sangre, sino que además se encontraban en el mismo porcentaje. En este análisis se incluían todas las variantes, no solamente las variantes raras.

El análisis 3.1 (Diferencias intraindividuo 1) resultó en una concordancia completa de presencia de variantes raras (MAF < 0,01). Las variantes diferentes encontradas se debieron a los problemas anteriormente planteados.

Por último, el análisis 3.2 (Diferencias intraindividuo 2), presentó los mismos resultados que el análisis 3.1. Las pequeñas diferencias halladas fueron variantes comunes en la población, con una frecuencia poblacional > 1%, por lo que se consideraron diferencias no interesantes para demostrar un origen genético somático de la ELA.

3. PUESTA A PUNTO DE DIFERENTES APROXIMACIONES DE SECUENCIACIÓN MASIVA COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA

3.1 Panel génico personalizado

Como primer resultado es preciso reflejar la confirmación de las variantes (*SOD1* p.V119L^C y *SETX* p.L521fsX8) en el paciente 255, la no presencia de variantes en 19 muestras previamente secuenciadas vía Sanger para el gen *SOD1*, y la presencia de variantes patogénicas previamente

halladas en familiares de los mismos: *TBK1* (p.R573G) en el paciente 153 y *TARDBP* (p.G295S) en el paciente 1838.

Para comenzar el análisis de las dos alternativas técnicas de secuenciación masiva utilizadas, se procede al desglose de variantes encontradas mediante secuenciación masiva dirigida mediante el diseño del panel génico presentado en “*Material y métodos*” (Tabla 34).

De esta manera, se pueden visualizar las 42 variantes encontradas en 39 de los 103 pacientes analizados por este método. Estas 42 variantes se dividen en 4 patogénicas, 17 probablemente patogénicas y 21 variantes de significado incierto (*VUS – Variant of Uncertain Significance*). Tres pacientes son portadores de más de una variante de interés.

Centrándonos en las 21 variantes de mayor interés, procedentes de la categoría 1 (variantes patogénicas) y categoría 2 (variantes probablemente patogénicas) de la Tabla 34, podemos desglosar la presencia de 4 variantes en *SOD1* y en *TARDBP*, 3 en *SQSTM1* y *CHCHD10*, 2 en *MAPT* y *SPG7* y una en *GRN*, *FIG4* y *PSEN1*. Entre las variantes denominadas *VUS* cabe destacar la presencia de una variante no descrita en *SOD1* (p.V5M), y variantes en genes de reciente descubrimiento en su relación con el fenotipo ELA, como *TUBA4A* (2), *TBK1* (2), *NEK1*, (2) *CCNF* (2), *KIF5A* y *ANXA11*.

ID	G	Gen	Cambio aa	Clínica	Alteración cognitiva	Lugar de inicio	Edad de inicio	Duración	HFP	GnomAD NFE_MAF exome
Categoría 1										
1894	F	<i>SOD1</i>	p.L84F ^C	ELA	NAC	Espinal	35	n.d.	ELAf	0
1751	F	<i>SOD1</i>	p.N139H ^C	ELA	NAC	Espinal	54	n.d.	No	0
1654	F	<i>TARDBP</i>	p.G298A	ELA-DFT	DFTvc	Bulbar	58	n.d.	ELAf	0
1538	F	<i>TARDBP</i>	p.N352S	ELA	n.d.	n.d.	76	n.d.	ELAf	0
Categoría 2										
1583	F	<i>TARDBP</i>	p.G295S ^{HOMO}	ELA	NAC	Espinal	36	n.d.	No	1,76x10 ⁻⁵
1514	M	<i>TARDBP</i>	p.G295S	ELA-DFT	DFTvc	Bulbar	41	n.d.	ELAf	1,76x10 ⁻⁵
1780	F	<i>SOD1</i>	p.D90A ^C	DFT	ANFP	-	66	n.d.	DTA	7,29x10 ⁻⁴
1685	M	<i>SOD1</i>	p.A140= ^C	ELA	NAC	Bulbar	63	55	No	5,63x10 ⁻⁴
1493	F	<i>SQSTM1</i>	p.A33V	ELA	NAC	Espinal	57	n.d.	ELAf	1,15x10 ⁻³
1689	M	<i>SQSTM1</i>	p.K238E	ELA	NAC	Bulbar	66	n.d.	No	3,63x10 ⁻³
1774	M	<i>SQSTM1</i>	p.R321C	DFT	DFTvc	-	56	169	No	6,5x10 ⁻⁴
1758	M	<i>GRN</i>	p.V519M ^O	DFT	DFTvc	-	64	70	No	6,15x10 ⁻⁵
1195	F	<i>MAPT</i>	p.S427F ^O	ELA-DFT	Algún rasgo	Espinal	61	n.d.	ELAf / DFTf	2,14x10 ⁻³
1609	F	<i>MAPT</i>	p.A469T ^{D, O}	DFT	DFTvc	-	72	n.d.	DFTf	2,29x10 ⁻³
1195	F	<i>CHCHD10</i>	p.P34S ^O	ELA-DFT	Algún rasgo	Espinal	61	n.d.	ELAf	5,01x10 ⁻³
1944	F	<i>CHCHD10</i>	p.P34S	ELA	NAC	Bulbar	70	44	No	5,01x10 ⁻³
1766	F	<i>CHCHD10</i>	p.P80L	DFT	DFTvc	-	60	n.d.	DFTf	2,28x10 ⁻⁴
1656	M	<i>FIG4</i>	p.I41T	ELA	NAC	Espinal	63	n.d.	ELAf	1,87x10 ⁻³
1952	M	<i>SPG7</i>	p.L78X	ELA	NAC	Bulbar	66	n.d.	No	1,23x10 ⁻⁴
1708	M	<i>SPG7</i>	p.A510V	ELA	NAC	n.d.	61	n.d.	ELAf / DFTf	4,95x10 ⁻³
1786	M	<i>PSEN1</i>	p.S365A	ELA	NAC	Espinal	51	n.d.	ELAf / DFTf	1,76x10 ⁻⁵
Categoría 3										
1997	M	<i>SOD1</i>	p.V5M ^C	ELA	NAC	Espinal	55	28	No	0
1526	M	<i>TBKI</i>	p.K551fsX23	ELA-DFT	DFTvc	Espinal	60	70	No	0

1647	M	TUBA4A	c.3+2T>G	ELA-DFT	DFTvc	Bulbar	53	n.d.	ELAf	0
1694	M	TUBA4A	p.G95E	DFT	DFTvc	-	60	n.d.	No	0
1459	M	NEK1	p.H769fsX2	ELA	NAC	Respiratorio	57	82	No	0
1680	M	NEK1	p.S975Y	DFT-ELA	DFTvc	Bulbar	70	180	No	0
1767	M	PSEN1	p.R60fsX14	DFT	DFTvc	-	67	74	No	0
1678	M	PSEN1	p.M292V	DFT	DFTvc	-	66	n.d.	DFTf	0
1653	F	CCNF	p.Y447D	ELA	NAC	Bulbar	64	28	ELAf	0
1787	F	CCNF	p.E575G	ELA	NAC	Espinal	64	n.d.	Otras E.N.	0
546	M	ANXA11	p.D90G	ELA	NAC	Espinal	18	n.d.	Otras E.N.	0
1972	M	ANXA11	p.E397D	DFT	DFT	-	n.d.	n.d.	ELAf / DFTf	0
731	M	ARPP21	p.P563Q	ELA	NAC	Espinal	60	23	ELAf	0
1669	M	CHCHD10	p.S126N	DFT	DFTvc	-	52	n.d.	No	0
1139	F	MATR3	p.S307N	ELA	NAC	Espinal	76	n.d.	ELAf	0
Categoría 4										
1627	F	TBK1	p.N42S	ELA	n.d.	Espinal	36	n.d.	ELAf	6,56x10 ⁻⁵
1529	F	FUS	p.G225_G227dup	ELA	NAC	Bulbar	39	44	ELAf	1,7x10 ⁻⁴
1113	M	KIF5A	p.R423H	ELA	NAC	Espinal	19	n.d.	ELAf	1,77x10 ⁻⁵
1409	F	DAO	p.G331E	ELA-DFT	DFT	n.d.	74	n.d.	DFTf	1,23x10 ⁻⁴
1825	M	DCTN1	p.A163S	DFT	ANFP	-	48	n.d.	No	9,64x10 ⁻⁶
1124	F	DCTN1	p.R497H	ELA	NAC	Espinal	44	n.d.	ELAf	8,81x10 ⁻⁶
1609	F	FLNC	p.T302M ^o	DFT	DFTvc	-	72	n.d.	DFTf	5,52x10 ⁻⁵
1758	M	FLNC	p.G802S ^o	DFT	DFTvc	-	64	70	No	4,44x10 ⁻⁵

Tabla 34. Características clínicas de los pacientes con variantes encontradas mediante panel génico.

ID = Identificación del paciente; **G** = Género del paciente, donde F se traduce como mujer y M como hombre; **Cambio aa** = cambio que genera la variante en la proteína; **Edad de inicio** = edad de inicio de síntomas en años; **Duración** = meses de supervivencia desde el inicio de síntomas hasta *exitus*; **HFP** = Historia Familiar Positiva. **NAC** = No alteración cognitiva; **DFT** = DFT sin tipificar; **DFTvc** = DFT variante conductual; **ANFP** = afasia no fluente progresiva; **DS** = demencia semántica **Otras E.N.** = otras enfermedades neurodegenerativas; **n.d.** = no disponible. “**Algún rasgo**” puede indicar factores como labilidad emocional, hipersexualidad, falta de comprensión de mensajes, etc. // ^{HOMO} pacientes con homocigosis para dicha variante; ^c utilización de la nomenclatura clásica en *SOD1* (donde el ATG iniciador no se contabiliza); ^d la variante en *MAPT* p.A469T también es conocida como p.A152T en htau40. ^o paciente con posible oligogenia. // El orden en el que se expresan las clínicas ELA-DFT y DFT-ELA indican los síntomas de qué patología se desarrolló inicialmente en el sujeto. HFP (historia familiar positiva) “ELAf / DFTf” indican la existencia de familiares tanto con ELA como con DFT.

3.2 WES

Se utilizó el WES como segunda alternativa de secuenciación masiva. Para comenzar el análisis se comprueban las variantes previamente halladas por secuenciación Sanger (*Tabla 29* de “*Material y métodos*”), salvo las variantes en *C9orf72* dada la propia limitación de la técnica. La única variante no encontrada mediante WES fue en el gen *TARDBP* (p.G295S) del paciente 2109. Por tanto, esto nos da un 94,7% de fiabilidad.

El WES, por su parte, permitió encontrar 56 variantes en 44 pacientes y 1 sujeto asintomático. Como se puede observar en la *Tabla 7*, se diferencian 3 variantes patogénicas, 25 probablemente patogénicas y 28 variantes de significado incierto (VUS).

Al igual que para la descripción de los resultados para el panel génico, se hace especial referencia a las 28 variantes de mayor interés (categoría 1 y categoría 2 de la *Tabla 35*). Así pues, se encuentran 8 variantes en *SQSTM1*, 4 en *MAPT* y *SPG7*, 3 en *TARDBP* y *TREM*, 2 en *TBK1* y una en los genes *CHMP2B*, *MPZ*, *CHCHD10*, *PRPH* y *B4GALNT1*. Por su parte, entre las VUS, nombrar principalmente la presencia de variantes no descritas en genes ampliamente estudiados como *FUS* (p.G231dup, p.Q126R) y *MAPT* (p.P143R) así como de variantes en genes de reciente descubrimiento como *TUBA4A* (1), *TBK1* (2), *CCNF* (2), *KIF5A* y *ANXA11*.

ID	G	Gen	Cambio aa	Clínica	Alteración cognitiva	Lugar de inicio	Edad de inicio	Duración	HFP	GnomAD NFE_MAF exome
Categoría 1										
309	F	TARDBP	p.N352S ^O	ELA	NAC	Espinal	52	n.d.	ELAf	0
2120	F	TARDBP	p.S393L ^O	ELA	n.d.	Espinal	55	n.d.	ELAf	0
1824	F	B4GALNT1 ^A	p.Q120X ^O	ELA	n.d.	Espinal	42	n.d.	ELAf	0
Categoría 2										
2346	M	TARDBP	p.G295S ^O	ELA	n.d.	Bulbar	75	n.d.	ELAf	1,76x10 ⁻⁵
1775	M	SQSTM1	p.A33V ^{O, F}	ELA	NAC	Espinal	55	n.d.	ELAf	1,15x10 ⁻³
2169	M	SQSTM1	p.R209C ^O	ELA-DFT	ANFP	Espinal	76	n.d.	ELAf	8,84x10 ⁻⁶
1134	M	SQSTM1	p.K238E ^O	DFT	DFT	-	75	n.d.	DFTf	3,63x10 ⁻³
2206	F	SQSTM1	p.K238E	DFT	DFTvc	-	65	n.d.	ELAf	3,63x10 ⁻³
1771	M	SQSTM1	p.R321C ^O	ELA	NAC	Espinal	16	n.d.	No	6,5x10 ⁻⁴
2111	M	SQSTM1	p.R321C ^O	ELA-DFT	Algún rasgo	Espinal	78	n.d.	No	6,5x10 ⁻⁴
1405 ^B	F	SQSTM1	p.P392L ^O	Asintomático	-	-	-	-	ELAf	1,45x10 ⁻³
1066	M	SQSTM1	p.P392L ^O	ELA-DFT	ANFP	Espinal	48	114	DTA	1,45x10 ⁻³
1374	M	TBK1	p.T79del ^O	ELA	NAC	Espinal	62	20	DFTf	9,59x10 ⁻⁶
1431	F	TBK1	p.I353V ^O	ELA	NAC	Espinal	72	n.d.	ELAf	8,81x10 ⁻⁶
1925	F	MAPT	p.S427F	DFT	DFT	-	62	-	ELAf	2,14x10 ⁻³
1930	M	MAPT	p.S427F	DFT	DFT	-	63	-	No	2,14x10 ⁻³
1276	M	MAPT	p.S427F	DFT-ELA	DFT	Bulbar	69	24	DFTf	2,14x10 ⁻³
2235	F	MAPT	p.A469T ^{C, O}	ELA	n.d.	Espinal	51	n.d.	ELAf	2,29x10 ⁻³
1821	M	CHMP2B	p.T83I ^O	DFT-ELA	DFTvc	Espinal	49	n.d.	DFTf	1,76x10 ⁻⁵
1065	M	TAF15	p.S390T	ELA-DFT	DFTvc	Espinal	40	129	No	2,64x10 ⁻⁵
2260	M	SPG7	p.A510V	DFT	DFTvc	-	65	n.d.	ELAf / DFTf	4,95x10 ⁻³
2074	M	SPG7	p.A510V ^O	ELA	n.d.	Espinal	36	n.d.	No	4,95x10 ⁻³
2346	M	SPG7	p.A510V ^O	ELA	n.d.	Bulbar	75	n.d.	ELAf	4,95x10 ⁻³
1815	F	SPG7	p.A510V	ELA	NAC	Espinal	77	n.d.	No	4,95x10 ⁻³
2004	M	CHCHD10	p.P34S	DFT	DFTvc	-	70	n.d.	No	5,01x10 ⁻³

1830	M	<i>TREM2</i>	p.R47H	ELA-DFT	DFTvc	Espinal	49	n.d.	DFTf	2,52x10 ⁻³
1643	F	<i>TREM2</i>	p.R62H	DFT	DFT	-	n.d.	n.d.	DFTf	1,12x10 ⁻²
1924	F	<i>TREM2</i>	p.R62H	DFT	DFT	-	83	n.d.	ELAf / DFTf	1,12x10 ⁻²
2177	F	<i>PRPH</i>	p.D141Y	ELA	n.d.	Espinal	54	n.d.	No	5,95x10 ⁻³
Categoría 3										
841	F	<i>CCNF</i>	p.S195R	ELA	NAC	Espinal	54	20	ELAf	0
2100	F	<i>FUS</i>	p.G231dup	ELA-DTA	DTA	Bulbar	n.d.	n.d.	No	0
2220	M	<i>FUS</i>	p.Q126R	ELA	NAC	Respiratorio	72	n.d.	ELAf	0
446	M	<i>MAPT</i>	p.P143R ⁰	ELA-DFT	DFT	Espinal	50	n.d.	EA	0
1066	M	<i>TBK1</i>	p.N254fsX4 ⁰	ELA-DFT	ANFP	Espinal	48	114	DTA	0
833	F	<i>TUBA4A</i>	p.R215C	ELA-DFT	DFT	Espinal	78	105	Otras E.N.	0
2228	M	<i>ERBB4</i>	p.E554D	ELA	n.d.	Espinal	52	n.d.	DFTf	0
2111	M	<i>FIG4</i>	p.P7R ⁰	ELA-DFT	Algún rasgo	Espinal	78	n.d.	No	0
175	M	<i>FIG4</i>	p.R197H	ELA-DFT	ANFP	Generalizado	62	25	No	0
2235	F	<i>KIF5A</i>	p.D1005fsX43 ⁰	ELA	n.d.	Espinal	51	n.d.	ELAf	0
1241	M	<i>VCP</i>	p.R744H ⁰	ELA	n.d.	n.d.	47	n.d.	ELAf	0
2197	F	<i>CHGB</i>	p.L85F	ELA-DFT	ANFP	Bulbar	73	n.d.	ELAf	0
2277	M	<i>CHGB</i>	p.P564L	ELA	n.d.	Bulbar	76	n.d.	No	0
1251	F	<i>ELP3</i>	p.E13X	DFT-ELA	DFT	Parkinsonismo	38	n.d.	ELAf	0
323	M	<i>SETX</i>	p.K598R	ELA-DFT	Algún rasgo	Espinal	39	29	No	0
2234	M	<i>SIGMAR1</i>	p.G165W	ELA	n.d.	Espinal	42	n.d.	ELAf	0
2234	M	<i>SIGMAR1</i>	p.R60L	ELA	n.d.	Espinal	42	n.d.	ELAf	0
2120	F	<i>SPG11</i>	p.K1641X ⁰	ELA	n.d.	Espinal	55	n.d.	ELAf	0
802	F	<i>SPG7</i>	p.P350S	ELA	NAC	Espinal	30	n.d.	No	0
2165	M	<i>STX12</i>	p.Q212fsX4 ⁰	ELA	NAC	Espinal	57	n.d.	ELAf	0
1134	M	<i>ATXN2</i>	p.G237S ⁰	DFT	DFT	-	75	n.d.	DFTf	0
1374	M	<i>C12orf65</i>	p.G69fsX20 ⁰	ELA	NAC	Espinal	62	20	DFTf	0
2309	M	<i>C21orf2</i>	p.E257K ⁰	ELA-DFT	DFTvc	Espinal	55	n.d.	No	0
1821	M	<i>TMEM106B</i>	p.Y248N ⁰	DFT-ELA	DFTvc	Espinal	49	n.d.	DFTf	0

1771	M	MME	p.E172Q ^O	ELA	NAC	Espinal	16	n.d.	No	0
Categoría 4										
1513	F	TBKI	p.E643del	ELA-DFT	DFTvc	Espinal	55	49	No	1,82x10 ⁻⁵
1943	M	CCNF	p.I282V	DFT	DFTvc	-	64	n.d.	DFTf	1,76x10 ⁻⁵
1190	M	NEK1	p.K648E	ELA-DFT	ANFP	Bulbar	64	n.d.	No	1,97x10 ⁻⁴
1828	M	ANXA11	p.G162R	ELA	NAC	Bulbar	43	n.d.	EM	7,18x10 ⁻⁵
2342	M	DCTN1	p.S659L	DFT	DS	-	59	n.d.	DFTf	8,8x10 ⁻⁶
2309	M	EPB41L1	p.R534W ^O	ELA-DFT	DFTvc	Espinal	55	n.d.	DFTf	8,81x10 ⁻⁶
2224	M	FIG4	p.A89V	ELA	n.d.	Espinal	75	n.d.	ELAf	4,39x10 ⁻⁵
2165	M	SETX	p.L223V ^O	ELA	NAC	Espinal	57	n.d.	ELAf	7,03x10 ⁻⁵
2001	F	SETX	p.A22T	ELA-DFT	Algún rasgo	Bulbar	80	n.d.	DFTf	2,02x10 ⁻⁴
438	M	ERBB4	p.I666T	ELA-DFT	DFTvc	Bulbar	36	n.d.	No	1,76x10 ⁻⁵
685	F	CHGB	p.R133X	ELA-DFT	Algún rasgo	Espinal	56	34	No	8,97x10 ⁻⁶

Tabla 35. Características clínicas de los pacientes con variantes encontradas mediante WES.

ID = Identificación del paciente; **G** = Género del paciente, donde F se traduce como mujer y M como hombre; **Cambio aa** = cambio que genera la variante en la proteína; **Edad de inicio** = edad de inicio de síntomas en años; **Duración** = meses de supervivencia desde el inicio de síntomas hasta *exitus*; **HFP** = Historia Familiar Positiva. **NAC** = No alteración cognitiva; **DFT** = DFT sin tipificar; **DFTvc** = DFT variante conductual; **ANFP** = afasia no fluente progresiva; **DS** = demencia semántica **Otras E.N.** = otras enfermedades neurodegenerativas; **n.d.** = no disponible. “**Algún rasgo**” puede indicar factores como labilidad emocional, hipersexualidad, falta de comprensión de mensajes, etc. // ^A gen descrito para *HSP26*; ^B sujeto asintomático en edad pre-sintomática (38 años) que además porta una RE en *C9orf72*; ^F sujeto incluido en WES, pero que es familiar de un caso índice del que no se disponía de más ADN (es incluido dado el hallazgo de una posible oligogenia aunque su otra variante descubierta por Sanger no aparece en la *Tabla 35*). ^O paciente con posible oligogenia. // El orden en el que se expresan las clínicas ELA-DFT y DFT-ELA indica los síntomas de qué patología se desarrolló inicialmente en el sujeto. Los paciente con HFP (historia familiar positiva) “ELAf / DFTf” indican la existencia de familiares tanto con ELA como con DFT. Las variantes señaladas en azul son variantes encontradas por otros grupos con los que colabora el Laboratorio de Investigación en ELA del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre: “Unidad Genética de Enf. Neurodegenerativas. LAB. P2-002. IIB Sant Pau - Barcelona” y “University of Massachusetts Medical School. Albert Sherman Center. Department of Neurology - Worcester, MA. USA”.

3.3 Panel génico VS WES

Para realizar una comparación exhaustiva entre el panel génico personalizado y la WES, vamos a suprimir de manera momentánea los resultados previos (*Tabla 36*) que poseíamos de colaboraciones con los grupos “Unidad Genética de Enf. Neurodegenerativas. LAB. P2-002. IIB Sant Pau - Barcelona” y “University of Massachusetts Medical School. Albert Sherman Center. Department of Neurology - Worcester, MA. USA”. Estos resultados se encontraban señalados en azul oscuro (*Tabla 35*).

	Panel génico	WES	Total
Pacientes analizados	103	108	211
Categoría 1	4	3	7
Categoría 2	17	25	42
Categoría 3	13	19	32
Categoría 4	8	9	12
Número de variantes	42	56	98
Pacientes con variante	39	44 ^A	83 ^A
Pacientes con oligogenia	3	19 ^B	22 ^B
% de pacientes con variante	37,9%	40,7%	39,3%

Tabla 36. Comparación de los resultados obtenidos mediante panel génico y WES. ^A hay un sujeto asintomático; ^B 11 de esos pacientes ya tenían caracterizada previamente una de las variantes mediante secuenciación Sanger.

Así pues, tras el análisis de la eficiencia de ambas técnicas, hay una gran paridad de resultados. La mayor diferencia se haya en la presencia del alto número de pacientes con oligogenia encontrados a través de la secuenciación exómica, si bien es cierto que como se indica en el pie de tabla, 11 de los 19 ya tenían caracterizada la primera de las variantes mediante secuenciación Sanger. Aun así, de 3 se pasaría a 8 el número de pacientes con posible modelo de herencia oligogénica gracias a la utilización del WES. Otro dato relevante es que el número de VUS (categoría 3 + categoría 4) no aumenta en gran medida en el WES a pesar de la inclusión de un número muy superior de genes en su análisis (el resto de comparaciones no son significativas).

Para evaluar la relación de dependencia entre la oligogenia y la técnica de secuenciación empleada, se realiza una tabla de contingencia (χ^2) obteniendo una relación muy significativa entre la probabilidad de detectar casos de oligogenia por medio del uso del WES en comparación con la técnica del panel génico (OR 7,12; IC 95% 2,22 – 23,22; $p = 0,0005$). Si eliminamos los 11 casos con variante hallada previamente, desaparece la significación ($p = 0,06$).

Para evaluar la relación entre el número de variantes encontradas mediante WES respecto de panel génico, también se realiza una tabla de contingencia (χ^2), no siendo significativo ($p > 0,05$).

Por otra parte, el número de pacientes analizados por cada técnica aparecen en la *Tabla 37*. Se puede discernir cómo en los grupos familiares aumenta en gran cantidad el número de variantes potencialmente patogénicas encontradas. Hasta en el 50% de los pacientes de ELAf en panel génico y un 56% en WES, así como un 60% en el grupo DFTf en WES. Sin embargo, los grupos ELAe (28,5% y 18,4%, en panel génico y WES, respectivamente) y DFTe (25% en panel génico) presentan un

porcentaje mucho menor de variantes. No se incluyen los porcentajes de varios grupos debido al reducido número de pacientes secuenciados mediante esas técnicas.

	ELAE	ELAf	ELA-DFTe	ELA-DFTf	DFTe	DFTf
Panel génico (total)	28	26	4	7	28	7
Panel génico con variante	8	13	2	5	7	4
WES (total)	38	25 ^A	11	16	5	13
WES con variante	7	14 ^A	4	9	2	8

Tabla 37. Comparación de clínicas en WES y panel génico y resultados positivos obtenidos. ^A sujeto asintomático (en edad pre-sintomático de 38 años).

Si reunimos los sujetos analizados mediante ambas técnicas, con antecedentes familiares (ELAf + DFTf + ELA-DFTf) y por otra parte los que carecen de antecedentes familiares (ELAE + DFTe + ELA-DFTe), se alcanzan las cifras de 94 y 114 sujetos respectivamente. De esta manera, con dos grupos de un número ya considerable, se puede apreciar que en el 56,4% del grupo familiar se ha encontrado al menos una variante potencialmente patogénica, mientras que en pacientes esporádicos disminuye al 26,3%.

4. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN ESPAÑOLA CON ELA Y/O DFT

Para este objetivo es necesario incluir los resultados obtenidos a través del análisis de la ER en *C9orf72* (Tabla 38) y en *ATXN2* (Tabla 40), así como de los resultados obtenidos mediante secuenciación tradicional Sanger (Tabla 39).

ID	G	Mutación	Clínica	Alteración cognitiva	Lugar de inicio	Edad de inicio	Duración	HFP
1428	F	ER <i>C9orf72</i>	DFT	DFT	-	56	n.d.	DFTf
1434	F	ER <i>C9orf72</i>	DFT	DFT	-	85	n.d.	EA
922	F	ER <i>C9orf72</i>	DFT-ELA	DFT	Bulbar	59	27	DFTf
622	M	ER <i>C9orf72</i>	DFT-ELA	DFTvc	Espinal	68	42	DFTf
810	M	ER <i>C9orf72</i>	DFT-ELA	DFTvc	Espinal	61	20	No
1201	F	ER <i>C9orf72</i>	DFT-ELA	Algún rasgo	Bulbar	59	43	ELAf
1633	M	ER <i>C9orf72</i>	ELA-DFT	ANFP	Espinal	51	27	DFTf
1772	M	ER <i>C9orf72</i>	ELA-DFT	DFTvc	Espinal	73	n.d.	ELAf
45	M	ER <i>C9orf72</i>	ELA-DFT	DFT	Bulbar	65	92	ELAf
807	M	ER <i>C9orf72</i>	ELA-DFT	DFT	Espinal	63	29	ELAf / DFTf
881	F	ER <i>C9orf72</i>	ELA-DFT	DFT	Espinal	66	n.d.	ELAf / DFTf
895	F	ER <i>C9orf72</i>	ELA-DFT	DFT	Bulbar	77	25	Otras E.N.
40	F	ER <i>C9orf72</i>	ELA-DFT	DS	Espinal	57	30	ELAf / DFTf
627	M	ER <i>C9orf72</i>	ELA-DFT	Algún rasgo	Bulbar	65	16	ELAf
867	M	ER <i>C9orf72</i>	ELA-DFT	Algún rasgo	Espinal	49	29	Otras E.N.
353	M	ER <i>C9orf72</i>	ELA-DFT	Algún rasgo	Espinal	54	28	Otras E.N.
711	F	ER <i>C9orf72</i>	ELA	NAC	Bulbar	56	57	ELAf
617	F	ER <i>C9orf72</i>	ELA	NAC	Bulbar	57	25	ELAf
19	M	ER <i>C9orf72</i>	ELA	NAC	Bulbar	57	35	ELAf

138	M	ER C9orf72	ELA	NAC	Espinal	36	39	ELAf
487	M	ER C9orf72	ELA	NAC	Espinal	37	n.d.	ELAf
20	M	ER C9orf72	ELA	NAC	Espinal	39	25	ELAf
136	F	ER C9orf72	ELA	NAC	Espinal	42	n.d.	ELAf
114	F	ER C9orf72	ELA	NAC	Espinal	49	33	ELAf
314	M	ER C9orf72	ELA	NAC	Espinal	53	n.d.	ELAf
31	M	ER C9orf72	ELA	NAC	Espinal	54	24	ELAf
507	M	ER C9orf72	ELA	NAC	Espinal	58	n.d.	ELAf
1132	F	ER C9orf72	ELA	NAC	Espinal	60	n.d.	ELAf
140	F	ER C9orf72	ELA	NAC	Espinal	67	95	ELAf
155	M	ER C9orf72	ELA	NAC	Espinal	50	52	ELAf / DFTf
282	M	ER C9orf72	ELA	NAC	Bulbar	52	42	No
785	F	ER C9orf72	ELA	NAC	Bulbar	55	57	No
407	M	ER C9orf72	ELA	NAC	Espinal	54	n.d.	No
258	M	ER C9orf72	ELA	NAC	Espinal	58	49	No
1739	F	ER C9orf72	ELA	NAC	Espinal	58	n.d.	No
518	F	ER C9orf72	ELA	NAC	Espinal	60	53	No
911	F	ER C9orf72	ELA	NAC	Espinal	62	n.d.	No
359	F	ER C9orf72	ELA	NAC	Espinal	65	13	No
1105	F	ER C9orf72	ELA	NAC	Espinal	72	38	No
794	M	ER C9orf72	ELA	NAC	Espinal	47	26	Otras E.N.
278	F	ER C9orf72	ELA	NAC	Espinal	50	47	Otras E.N.
1466	M	ER C9orf72	ELA	NAC	n.d.	52	n.d.	Otras E.N.
949	F	ER C9orf72	ELA	NAC	Respiratorio	71	n.d.	Otras E.N.
528	M	ER C9orf72	ELA	n.d.	Bulbar	42	n.d.	ELAf
916	F	ER C9orf72	ELA	n.d.	Bulbar	59	n.d.	ELAf
36	F	ER C9orf72	ELA	n.d.	Bulbar	65	n.d.	ELAf
1532	M	ER C9orf72	ELA	n.d.	Bulbar	n.d.	n.d.	ELAf
1312	M	ER C9orf72 ^A	ELA	n.d.	Espinal	45	n.d.	ELAf
72	F	ER C9orf72	ELA	n.d.	Espinal	51	n.d.	ELAf
964	M	ER C9orf72	ELA	n.d.	Generalizado	47	n.d.	ELAf
23	M	ER C9orf72	ELA	n.d.	n.d.	48	n.d.	ELAf
2148	F	ER C9orf72	ELA	n.d.	Bulbar	37	n.d.	No
149	M	ER C9orf72	ELA	n.d.	Espinal	43	n.d.	No
2301	M	ER C9orf72	ELA	n.d.	n.d.	57	n.d.	No
776	M	ER C9orf72	ELA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	No
851	F	ER C9orf72	ELA	n.d.	Espinal	69	48	Otras E.N.
1405 ^B	F	ER C9orf72 ^O	Asintomática	n.d.	-	-	-	ELAf

Tabla 38. Características clínicas de los pacientes con ER en C9orf72.

ID = Identificación del paciente; **G** = Género del paciente, donde F se traduce como mujer y M como hombre; **Edad de inicio** = edad de inicio de síntomas en años; **Duración** = meses de supervivencia desde el inicio de síntomas hasta *exitus*; **HFP** = Historia Familiar Positiva. **NAC** = No alteración cognitiva; **DFT** = DFT sin tipificar; **DFTvc** = DFT variante conductual; **ANFP** = afasia no fluente progresiva; **DS** = demencia semántica **Otras E.N.** = otras enfermedades neurodegenerativas; **n.d.** = no disponible. “**Algún rasgo**” puede indicar factores como labilidad emocional, hipersexualidad, falta de comprensión de mensajes, etc. // ^A este sujeto presenta expansión en los dos alelos. ^B sujeto asintomático en edad pre-sintomática (38 años) que además porta la variante p.P392L en *SQSTM1* (^O). // El orden en el que se expresan las clínicas ELA-DFT y DFT-ELA indica los síntomas de qué patología se desarrolló inicialmente en el sujeto. Cuando HFP (historia familiar positiva) es “ELAf / DFTf” indican la existencia de familiares tanto con ELA como con DFT.

ID	G	Gen	Cambio aa	Clínica	Alteración cognitiva	Lugar de inicio	Edad de inicio	Duración	HFP	GnomAD NFE_MAF exome
446	M	<i>SOD1</i>	p.K3E ^{C,O}	ELA-DFT	DFT	Espinal	50	n.d.	Otras E.N.	0
309	F	<i>SOD1</i>	p.N19S ^{C,O}	ELA	NAC	Espinal	52	n.d.	ELAf	1,77x10 ⁻⁴
484	F	<i>SOD1</i>	p.E21G ^C	ELA	n.d.	n.d.	46	n.d.	ELAf	0
508	M	<i>SOD1</i>	p.Q22L ^C	ELA	NAC	Espinal	71	26	ELAf	0
931	F	<i>SOD1</i>	p.Q22L ^C	ELA	n.d.	n.d.	47	n.d.	ELAf	0
1274	F	<i>SOD1</i>	p.Q22L ^C	ELA	n.d.	Espinal	64	21	No	0
16	F	<i>SOD1</i>	p.G37R ^C	ELA	NAC	Espinal	41	120	ELAf	0
324	M	<i>SOD1</i>	p.G37R ^C	ELA	NAC	Espinal	51	n.d.	ELAf	0
328	F	<i>SOD1</i>	p.G37R ^C	ELA	NAC	Espinal	26	50	ELAf	0
369	M	<i>SOD1</i>	p.G37R ^C	ELA	NAC	Espinal	32	n.d.	ELAf	0
1859	M	<i>SOD1</i>	p.G37R ^C	ELA	NAC	Espinal	44	n.d.	ELAf	0
1866	F	<i>SOD1</i>	p.G37R ^C	ELA	n.d.	Espinal	26	n.d.	ELAf	0
1872	M	<i>SOD1</i>	p.G37R ^C	ELA	n.d.	n.d.	40	n.d.	ELAf	0
958	F	<i>SOD1</i>	p.E40D ^C	ELA	NAC	Espinal	32	n.d.	No	0
161	F	<i>SOD1</i>	p.N65S ^C	ELA	NAC	Espinal	43	343	No	0
1431	F	<i>SOD1</i>	p.N65S ^{C,O}	ELA	NAC	Espinal	72	n.d.	ELAf	0
2074	M	<i>SOD1</i>	p.N65S ^{C,O}	ELA	n.d.	Espinal	36	n.d.	No	0
485	F	<i>SOD1</i>	p.L84F ^C	ELA	NAC	Espinal	36	57	ELAf	0
800	F	<i>SOD1</i>	p.D90A ^C	ELA	NAC	Espinal	60	n.d.	ELAf	7,29x10 ⁻⁴
121	M	<i>SOD1</i>	p.D90A ^{C,HOMO}	ELA-DFT	Algún rasgo	Espinal	36	n.d.	ELAf	7,29x10 ⁻⁴
527	M	<i>SOD1</i>	p.G93S ^C	ELA	NAC	Espinal	50	n.d.	ELAf	0
68	M	<i>SOD1</i>	p.Del(L106,S107) ^C	ELA	n.d.	n.d.	33	n.d.	ELAf	0
1091	F	<i>SOD1</i>	p.L106V ^C	ELA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	ELAf	0
1824	F	<i>SOD1</i>	p.L106V ^{C,O}	ELA	n.d.	Espinal	43	n.d.	ELAf	0
2094	M	<i>SOD1</i>	p.I112T ^{C,O}	ELA	n.d.	n.d.	50	n.d.	ELAf	0
1241	M	<i>SOD1</i>	p.I113T ^{C,O}	ELA	n.d.	n.d.	46	n.d.	ELAf	1,05x10 ⁻⁴

165	M	<i>SOD1</i>	p.L117V ^C	ELA	NAC	Espinal	33	n.d.	ELAf	0
255	F	<i>SOD1</i>	p.V119L ^{C, O}	ELA	NAC	Espinal	26	n.d.	No	0
1204	F	<i>SOD1</i>	p.V119L ^C	ELA	NAC	Bulbar	65	60	No	0
2165	M	<i>SOD1</i>	p.L126fsX7 ^{C, O}	ELA	NAC	Espinal	58	n.d.	ELAf	0
442	F	<i>SOD1</i>	p.N139H ^C	ELA	NAC	Espinal	41	25	ELAf	0
1959	M	<i>SOD1</i>	p.N139H ^C	ELA	n.d.	Espinal	43	n.d.	ELAf	0
1023	F	<i>SOD1</i>	p.N139H ^C	ELA-DFT	Algún rasgo	Espinal	54	45	No	0
2200	F	<i>SOD1</i>	p.R143P ^C	ELA	NAC	Generalizado	58	n.d.	No	0
2363	M	<i>SOD1</i>	p.L144F ^C	ELA	n.d.	Espinal	61	n.d.	No	0
52	M	<i>SOD1</i>	p.I149T ^C	ELA	NAC	n.d.	48	n.d.	ELAf	1,76x10 ⁻⁵
1500	F	<i>SOD1</i>	p.I149T ^C	ELA	NAC	Espinal	96	n.d.	ELAf	1,76x10 ⁻⁵
86	F	<i>SOD1</i>	p.I151T ^C	ELA	n.d.	Espinal	28	140	ELAf	0
21	M	<i>TARDBP</i>	p.G294V	ELA	n.d.	Bulbar	58	n.d.	ELAf	2,64x10 ⁻⁵
2109	F	<i>TARDBP</i>	p.G295S	ELA-DFT	ANFP	Espinal	76	n.d.	Otras E.N.	1,76x10 ⁻⁵
2326	M	<i>TARDBP</i>	p.N352S	ELA	n.d.	Espinal	n.d.	n.d.	No	0
1217	F	<i>TARDBP</i>	p.I383V	DFT	DS	n.d.	50	n.d.	ELAf	1,89x10 ⁻⁵
115	F	<i>FUS</i>	p.P525L	ELA	n.d.	n.d.	22	n.d.	No	8,79x10 ⁻⁶
191	F	<i>FUS</i>	p.P525L	ELA	NAC	Bulbar	33	7	No	8,79x10 ⁻⁶
2157	F	<i>FUS</i>	p.P525L	ELA	n.d.	Espinal	27	n.d.	Otras E.N.	8,79x10 ⁻⁶
1196	F	<i>GRN</i>	p.R161M	DFT	DFT	-	67	n.d.	No	0
1407	F	<i>GRN</i>	p.R161M	DFT	DFT	-	67	n.d.	DFTf	0
624	M	<i>GRN</i>	p.G515A	DFT	DFT	-	39	n.d.	No	2,9x10 ⁻⁴
153	M	<i>TBKI</i>	p.R573G	ELA-DFT	Algún rasgo	Espinal	68	88	DFTf	0
535	M	<i>ANG</i>	p.K64X	ELA	NAC	Espinal	74	78	ELAf	0
419	M	<i>ANG</i>	p.G123A	ELA	n.d.	Generalizado	60	n.d.	No	5,27x10 ⁻⁵
255	F	<i>SETX</i>	p.L521fsX8 ^O	ELA	NAC	Espinal	25	n.d.	No	0
1388	M	<i>SPG11</i>	p.A2035D ^{HOMO}	ELA	n.d.	Espinal	38	n.d.	No	0

Tabla 39. Características clínicas de los pacientes con variantes patogénicas o probablemente patogénicas secuenciados por Sanger.

ID = Identificación del paciente; **G** = Género del paciente, donde **F** se traduce como mujer y **M** como hombre; **Cambio aa** = cambio que genera la variante en la proteína; **Edad de inicio** = edad de inicio de síntomas en años; **Duración** = meses de supervivencia desde el inicio de síntomas hasta *exitus*; **HFP** = Historia Familiar Positiva. **NAC** = No alteración cognitiva; **DFT** = DFT sin tipificar; **ANFP** = afasia no fluente progresiva; **DS** = demencia semántica; **Otras E.N.** = otras enfermedades neurodegenerativas; **n.d.** = no disponible. “**Algún rasgo**” puede indicar factores como labilidad emocional, hipersexualidad, falta de comprensión de mensajes, etc. // ^{HOMO} pacientes con homocigosis para dichas variantes; ^C utilización de la nomenclatura clásica en *SOD1* (donde el ATG iniciador no se contabiliza). ^O paciente con posible oligogenia. // El orden en el que se expresan las clínicas ELA-DFT y DFT-ELA indica los síntomas de qué patología se desarrolló inicialmente en el sujeto. Los paciente con HFP (historia familiar positiva) “ELAf / DFTf” indican la existencia de familiares tanto con ELA como con DFT.

*En esta tabla las variantes no se clasifican por Categorías.

**El resultado de los pacientes señalados en azul oscuro fue obtenido previamente al comienzo de esta tesis.

Por otra parte, como se puede ver en la *Figura 7*, se realizó de igual manera la valoración de la expansión en *ATXN2* como factor de riesgo descrito previamente en otros artículos. En este caso se analizaron 194 pacientes de los cuáles hay 145 ELA y 49 DFT.

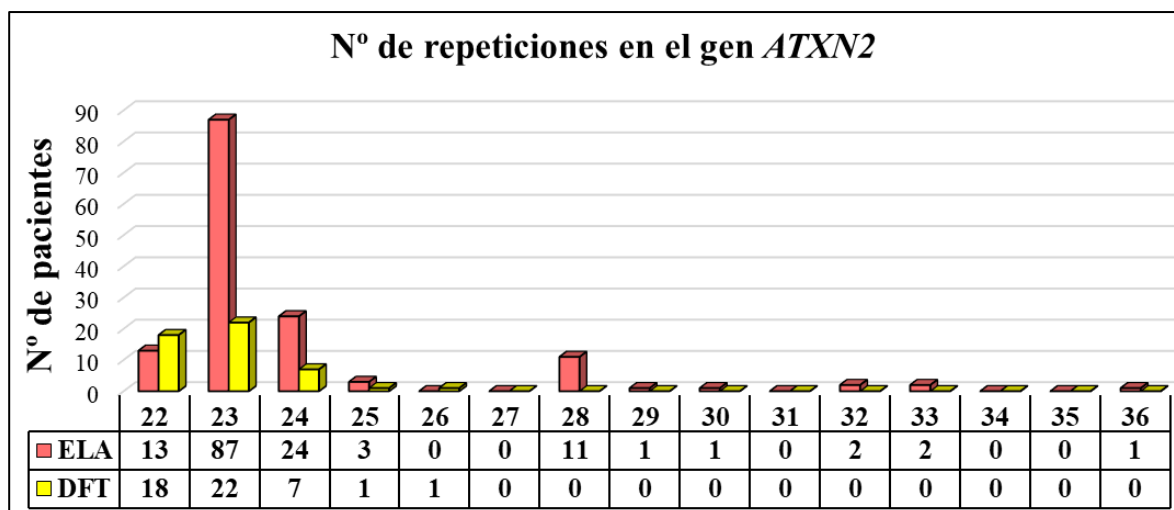


Figura 7. Representación del número de pacientes portadores de diferentes longitudes en la ER del gen *ATXN2*, en pacientes ELA y pacientes DFT.

Se observa que en el rango 27-33 repeticiones hay 18 ELA (12,4%). Si el rango se restringe a ≥ 30 repeticiones, el número disminuye a 6 ELA (4,1%). Los 6 casos poseen antecedentes familiares, 5 de ellos de ELA y 1 DFT. Además, un caso de las ELA^f y el caso de DFT^f, son pacientes con ELA que posteriormente desarrollaron DFT (*Tabla 40*).

ID	G	Reps	Clínica	Alteración cognitiva	Lugar de inicio	Edad de inicio	Duración	HFP
4	F	22 / 30	ELA	n.d.	n.d.	59	n.d.	ELA ^f
29	M	22 / 32	ELA	NAC	Bulbar	40	n.d.	ELA ^f
284	M	22 / 33	ELA	NAC	Espinal	70	54	ELA ^f
2094	M	22 / 32 ^o	ELA	n.d.	n.d.	51	n.d.	ELA ^f
2169	M	22 / 36 ^{A,o}	ELA-DFT	ANFP	Espinal	76	n.d.	ELA ^f
2309	M	22 / 33 ^o	ELA-DFT	DFT ^{vc}	Espinal	54	n.d.	DFT ^f

Tabla 40. Características clínicas de los pacientes con expansión intermedia en *ATXN2*.

ID = Identificación del paciente; G = Género del paciente, donde F se traduce como mujer y M como hombre; Edad de inicio = edad de inicio de síntomas en años; Duración = meses de supervivencia desde el inicio de síntomas hasta *exitus*; HFP = Historia Familiar Positiva. NAC = No alteración cognitiva; DFT^{vc} = DFT variante conductual; ANFP = afasia no fluente progresiva; n.d. = no disponible. ^A este sujeto presenta expansión considerada como autosómica dominante para SCA2. ^opaciente con posible oligogenia. ELA-DFT = pacientes con sintomatología inicial de ELA que desarrollaron una alteración cognitiva posteriormente.

Para realizar la caracterización de la población española con ELA y/o DFT se agrupan todos los resultados obtenidos mediante las técnicas tradicionales y los NGS (*Tabla C - Anexo II*) y se cuantifican a su vez los pacientes caracterizados (*Tabla D - Anexo II*).

Se representan por separado los genes clásicamente relacionados con la ELA y la DFT en cada uno de los 5 grupos (*Figura 8*).

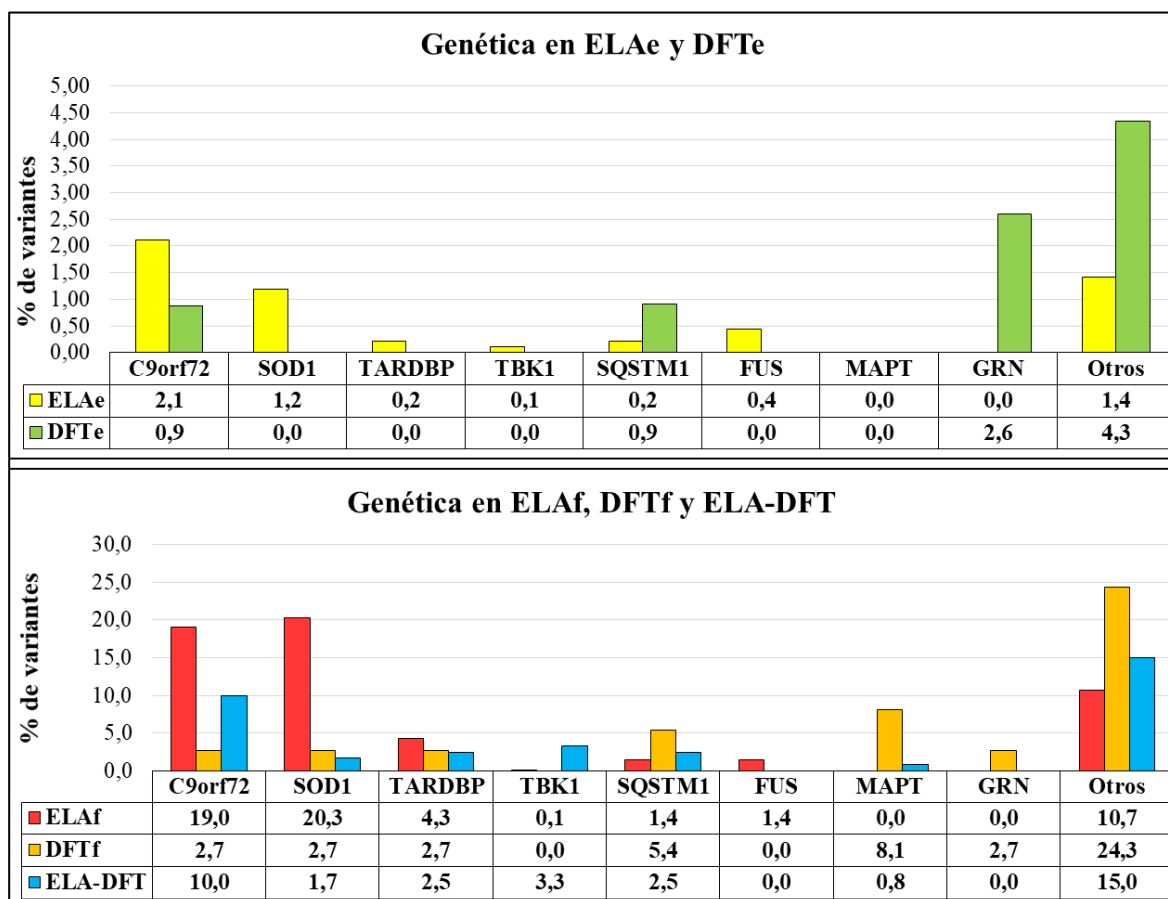


Figura 8. Genética descrita en la población española. En la parte superior se observan los grupos esporádicos y en la parte inferior los grupos familiares así como el grupo de pacientes con comorbilidad ELA-DFT. Trabajo basado en la caracterización de pacientes en el Laboratorio de Investigación en ELA del Instituto de Investigación i+12.

Atendiendo al eje vertical de las gráficas presentes en la *Figura 8* se puede observar cómo los diferentes genes apenas aportan pequeños porcentajes en las enfermedades esporádicas, siendo los más reseñables *C9orf72* para ambos grupos, *SOD1* en ELAe y *GRN* en DFT. Estos mismos genes sí tienen una gran relevancia en los grupos familiares y en el grupo ELA-DFT, destacando a su vez la gran aportación de la ER en *C9orf72*, *SOD1* en ELAf, *TARDBP* en ELAf y DFTf y *MAPT* en DFTf. A su vez, también es destacable la aportación de *SQSTM1* en estos 3 grupos. Por último, los porcentajes que se desgranar en “Otros” también hacen ver la enorme diferencia entre los grupos de la parte superior y de la parte inferior (hay que tener especial cuidado en la interpretación de los resultados en DFTf debido al bajo número del que se dispuso “37” - por ejemplo, el 2,7% representa únicamente a un paciente).

Para observar los porcentajes de pacientes caracterizados molecularmente como de pacientes de los cuales es desconocido el diagnóstico genético, se realiza la *Figura 9*. Se puede ver de manera directa cómo el porcentaje de pacientes con genética conocida es muy elevado en la ELAf (57%), en la DFTf (49%) y alrededor de 1/3 en ELA-DFT. Los resultados positivos en ELAe y DFTe son muy bajos. Es importante hacer hincapié en que para estos porcentajes, como para el resto de anteriores

resultados, se utilizan exclusivamente casos índice. Este aspecto es especialmente relevante a la hora de analizar porcentajes en los grupos familiares, pues podrían dar lugar a una sobrevaloración si se incluyese el gran número de familiares afectados.

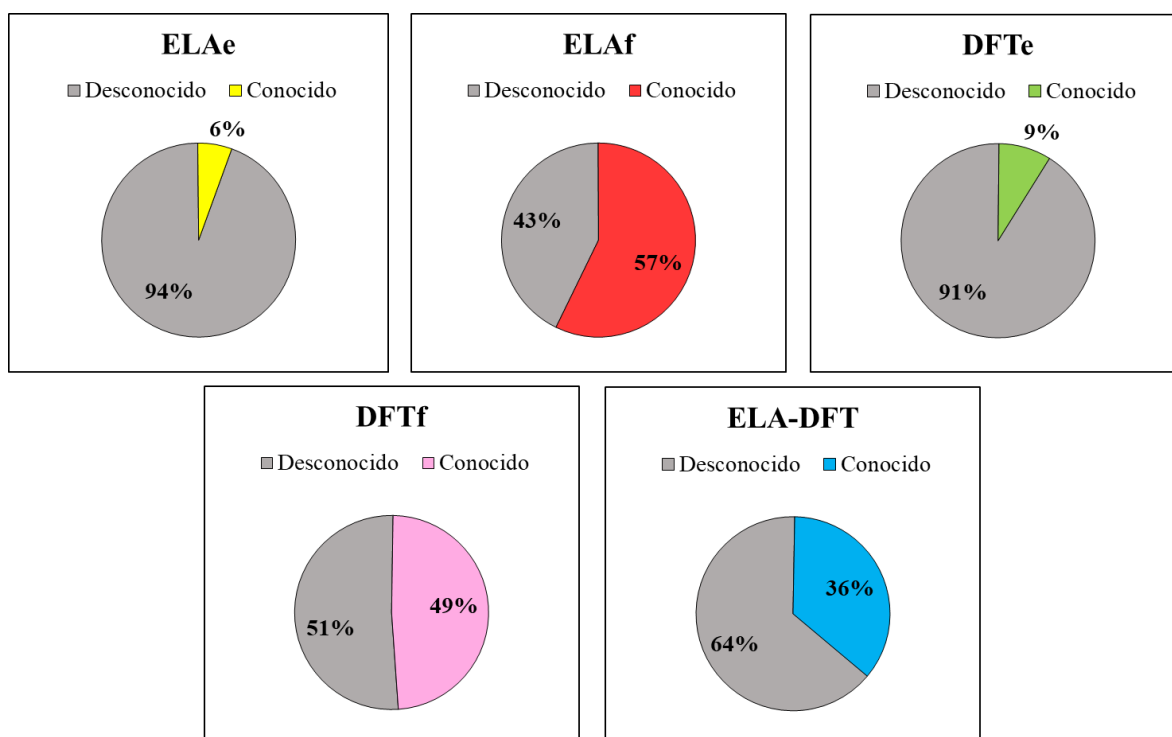


Figura 9. Porcentaje de conocimiento genético según la clínica. Comparación de los resultados genéticos obtenidos en cada grupo en la población española.

Basado en los resultados del Laboratorio de Investigación en ELA del Instituto de Investigación i+12.

5. ANÁLISIS DE LA OLIGOGENIA

Evaluamos el número de variantes genéticas procedentes de distinto gen, es decir, sin contabilizar casos de heterocigosis compuesta, potencialmente patogénicas en cada individuo. Un total de 24 pacientes (1,8% del total de pacientes; 7,8% en pacientes con HFP en ELA, DFT u otras enfermedades neurodegenerativas; 0,5% en pacientes ELA o DFT esporádicos) albergaban variantes potencialmente patogénicas en al menos 2 genes del espectro ELA-DFT. Veintidós pacientes eran portadores de 2 variantes, mientras que únicamente 2 pacientes portaban 3 variantes cada uno (*Tabla 41*). Once sujetos potencialmente oligogénicos tenían antecedentes familiares con ELA, 6 con antecedentes de DFT, 1 con antecedentes tanto de ELA como de DFT y otro con familiares con EA.

Curiosamente, 10 de los pacientes preseleccionados para secuenciación exómica que eran portadores de una variante en *SOD1*, fueron portadores de otra variante de interés más. De estos 10 pacientes, 2 no tenían historia familiar positiva para ELA o DFT. Los casos 309, 1775, 1824, 2074 y 2346 portan además variantes reportadas previamente como patogénicas. Asimismo, en otras ocasiones (2094, 2169, 2309) portan una expansión CAG de tamaño intermedio en *ATXN2*. Únicamente 5 pacientes son considerados esporádicos (un caso curioso es la presencia de un sujeto

asintomático que porta la ER en *C9orf72* así como la mutación p.P392L en *SQSTM1*, se trata de una mujer en edad pre-sintomática (38 años) con historia familiar en ELA).

Paciente	Clínica	HFP	Variantes
255	ELA	No	<i>SOD1</i> p.V119L ^C <i>SETX</i> p.L521fsX8
309	ELA	ELAf	<i>TARDBP</i> p.N352S <i>SOD1</i> p.N19S
446	ELA-DFT	EA ^D	<i>SOD1</i> p.K3E ^C <i>MAPT</i> p.P143R
1066	ELA-DFT	DFTf	<i>SQSTM1</i> p.P392L <i>TBK1</i> p.N254fsX4
1134	DFT	DFTf	<i>SQSTM1</i> p.K238E <i>ATXN2</i> p.G237S
1195	ELA-DFT	ELAf / DFTf	<i>CHCHD10</i> p.P34S <i>MAPT</i> p.S427F
1241	ELA	ELAf	<i>SOD1</i> p.I113T ^C <i>VCP</i> p.R744H
1374	ELA	DFTf	<i>TBK1</i> p.T79del <i>C12orf65</i> p.G69fsX20
1405 ^B	Asintomática	ELAf	ER <i>C9orf72</i> <i>SQSTM1</i> p.P392L
1431	ELA	ELAf	<i>SOD1</i> p.N65S ^C <i>TBK1</i> p.I353V
1609	DFT	DFTf	<i>MAPT</i> p.A469T ^A <i>FLNC</i> p.T302M
1758	DFT	No	<i>GRN</i> p.V519M <i>FLNC</i> p.G802S
1771	ELA	No	<i>SQSTM1</i> p.R321C <i>MME</i> p.E172Q
1775	ELA	ELAf	<i>SOD1</i> p.L117V ^C <i>SQSTM1</i> p.A33V
1821	DFT-ELA	DFTf	<i>CHMP2B</i> p.T83I <i>TMEM106B</i> p.Y248N
1824	ELA	ELAf	<i>SOD1</i> p.L106V ^C <i>B4GALNT1</i> p.Q120X
2074	ELA	No	<i>SOD1</i> p.N65S ^C <i>SPG7</i> p.A510V
2094	ELA	ELAf	<i>SOD1</i> p.I112T <i>ATXN2</i> 22/32
2111	ELA-DFT	No	<i>SQSTM1</i> p.R321C <i>FIG4</i> p.P7R
2120	ELA	ELAf	<i>TARDBP</i> p.S393L <i>SPG11</i> p.K1641X
2165	ELA	ELAf	<i>SOD1</i> p.L126fsX7 ^C <i>SETX</i> p.L223V <i>STX12</i> p.Q212fsX4
2169	ELA-DFT	ELAf	<i>SQSTM1</i> p.R209C <i>ATXN2</i> 22/36
2235	ELA	ELAf	<i>KIF5A</i> p.D1005fsX43 <i>MAPT</i> p.A469T ^A
2309	ELA-DFT	DFTf	<i>EPB41L1</i> p.R534W <i>C21orf2</i> p.E257K <i>ATXN2</i> 22/33
2346	ELA	ELAf	<i>TARDBP</i> p.G295S <i>SPG7</i> p.A510V

Tabla 41. Conjunto de pacientes portadores de más de una variante patogénica, probablemente patogénica y/o rara (MAF < 0,001) y posible tipo de modelo de herencia.

^A la variante en *MAPT* p.A469T también es conocida como p.A152T en *htau40*; ^B sujeto asintomático en edad pre-sintomática (38 años) con una historia familiar muy completa (no se tendrá en cuenta para los porcentajes); ^C indica la utilización de la nomenclatura clásica en *SOD1* (donde el ATG iniciador no se contabiliza). ^D paciente con antecedentes familiares de EA (Enfermedad de Alzheimer). // El orden en el que se expresan las clínicas ELA-DFT y DFT-ELA indican los síntomas de qué patología se desarrolló inicialmente en el sujeto. El paciente con HFP (historia familiar positiva) “ELAf / DFTf” indica la existencia de familiares tanto con ELA como con DFT.

También es relevante el alto porcentaje de aparición de variantes en *SQSTM1* en conjunto con otras variantes. Especialmente destacable es el caso del sujeto asintomático (portador de la ER en *C9orf72*) y en el paciente 1775 (portador de la variante p.L117V^C en *SOD1*).

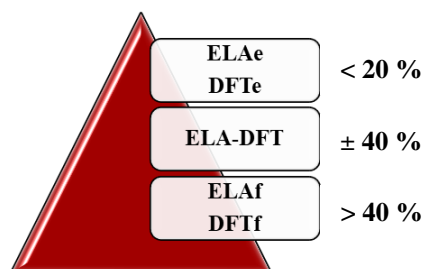
6. DISEÑO DE UN ALGORITMO MOLECULAR DIAGNÓSTICO EN PACIENTES CON ELA Y/O DFT

Los factores que se han tenido en cuenta para dar estructura al algoritmo son, por una parte, el coste de cada técnica y su disponibilidad, y por otra, el número de muestras que se reciben. Además, el diseño se va a fundamentar en los resultados anteriormente descritos. De especial utilidad son la *Figura 8* (Genética descrita en la población española), la *Figura 9* (Porcentaje de conocimiento genético según la clínica) y la *Tabla 36* (Comparación de los resultados obtenidos mediante panel génico y *WES*).

Para comenzar, al analizar los datos de la *Tabla 42* se puede realizar una primera división entre pacientes esporádicos (ELAe y DFTe) y pacientes con antecedentes (ELAf y DFTf). En el medio quedan los pacientes ELA-DFT. Esta primera división se basa en los porcentajes de resultados conocidos y desconocidos para cada grupo.

	Conocido	Desconocido
ELAe	6%	94%
DFTe	9%	91%
ELA-DFT	36%	64%
DFTf	49%	51%
ELAf	57%	43%

Tabla 42. Datos extraídos de la *Figura 9*.



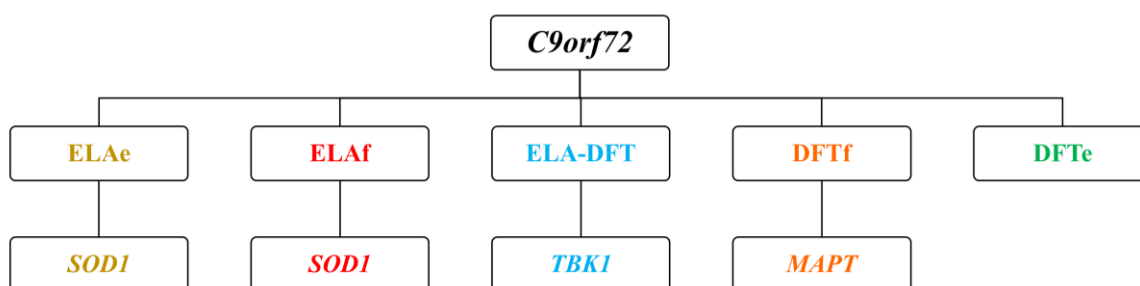
Continuando con el desglose, aunque se puede realizar una pequeña diferenciación entre los grupos ELA-DFT esporádico y familiar, dado que es un grupo especialmente característico, se mantiene como un bloque único (ELA-DFT = ELA-DFTe + ELA-DFTf).

Utilizando el número de variantes descubiertas mediante secuenciación Sanger (*Tabla 39*) y el estudio de la ER en *C9orf72* (*Tabla 40*), se mantiene como primera opción para los 3 grupos previos, el análisis de la ER en *C9orf72*. La inclusión del análisis de *C9orf72* en los grupos de ELAf y ELA-DFT obedece al porcentaje de aparición de la expansión (10,0% en ELA-DFT, 19,0% en ELAf), mientras que en ELAe se debe al número de pacientes (18 pacientes positivos, 2,1%). También

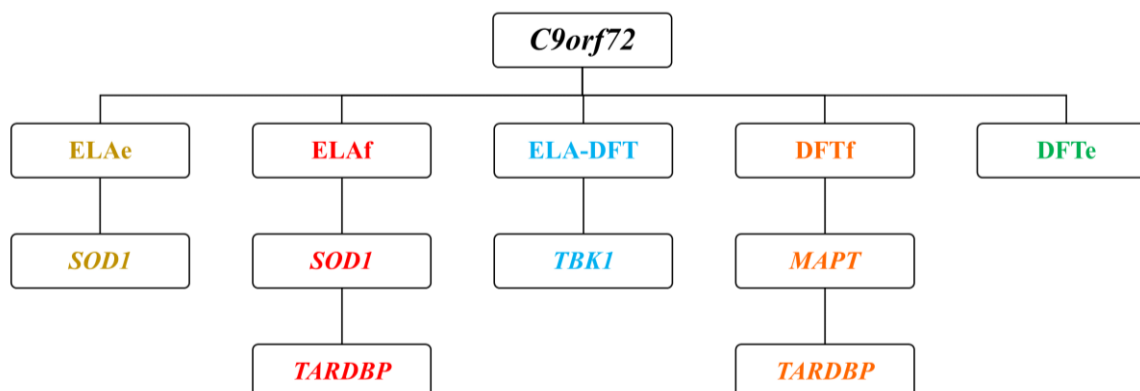
se incluye su análisis en los grupos DFTf (2,7%) y DFTe (0,9%) a consecuencia del porcentaje de casos con comorbilidad posterior.

Al mismo nivel se incluye el análisis de *SOD1* en ELAf (20,3%) mientras que para ELAe (1,2%) queda relegado a un segundo nivel de prioridad. Entre los grupos de DFTf y DFTe se incluye el análisis de *MAPT* (8,1%) en el grupo familiar. Siempre recordando que los porcentajes del grupo DFTf pueden encontrarse desvirtuados debido al bajo número de pacientes (37) que lo conforman.

Para concluir con el primer escalón de cribado, se debe relacionar el grupo ELA-DFT con el gen *TBK1* (3,3%).



Seguidamente, *TARDBP* se considera una segunda opción para la ELAf (4,3%). Concretando, se puede considerar como análisis dirigido el exón 6 de *TARDBP*, dado que alberga el 95% de las mutaciones. Este último paso es factible debido a que el número de sujetos con antecedentes familiares es bajo en ambos casos. La secuenciación Sanger se puede considerar costo-efectiva hasta este punto, comenzando a incluirse la opción de *NGS* como método preferente en el diagnóstico genético. Sin embargo, *SQSTM1* para la DFTf (5,4%) puede ser menos costo-efectiva debido al número de fragmentos de este gen, por lo que aunque haya un paciente más con variante en *SQSTM1* que en *TARDBP* (2,7%) para DFTf, se mantiene el análisis exón 6a de *TARDBP* mediante secuenciación Sanger por delante de *SQSTM1*.



Una vez priorizada la secuenciación Sanger, es necesaria la valoración de la conveniencia del gasto de recursos en los grupos esporádicos debido a que el 95% y 92% de los pacientes de ELAe y DFTe, respectivamente, no poseen un diagnóstico genético conocido a través de secuenciación

masiva. Estos dos grupos poseen porcentajes muy bajos de variantes encontradas en genes minoritarios (1,0% en ELAe, 3,5% en DFTe) mediante secuenciación masiva.

Sin embargo, los grupos familiares poseen alto número de pacientes con variantes en genes minoritarios (10,7% en ELAf, 24,3% en DFTf) por lo que es viable la realización de técnicas de secuenciación masiva dirigida. El grupo ELA-DFT (15,0%) también se encuentra en la misma posición. En este punto, se sitúa *SQSTM1* como gen central en los 3 grupos (1,4% en ELAf, 5,4% en DFTf, 2,5% en ELA-DFT).

Para concluir, el algoritmo diagnóstico molecular final incluye la posibilidad de la llegada de pacientes de edad inusualmente temprana sin historia familiar previa. Estos pacientes son susceptibles del análisis del gen *FUS*. Tres de los 13 pacientes juveniles sin antecedentes familiares poseen la mutación p.P525L en el exón 15 de *FUS* (23%). Existe un consenso general sobre la consideración juvenil en pacientes con inicio de síntomas menores a los 40 años.

Por último, se incluye el estudio de la expansión “CAG” en el gen del receptor de andrógenos (*AR*) como análisis preferente en pacientes con AMP de lenta evolución (*Figura 10*).

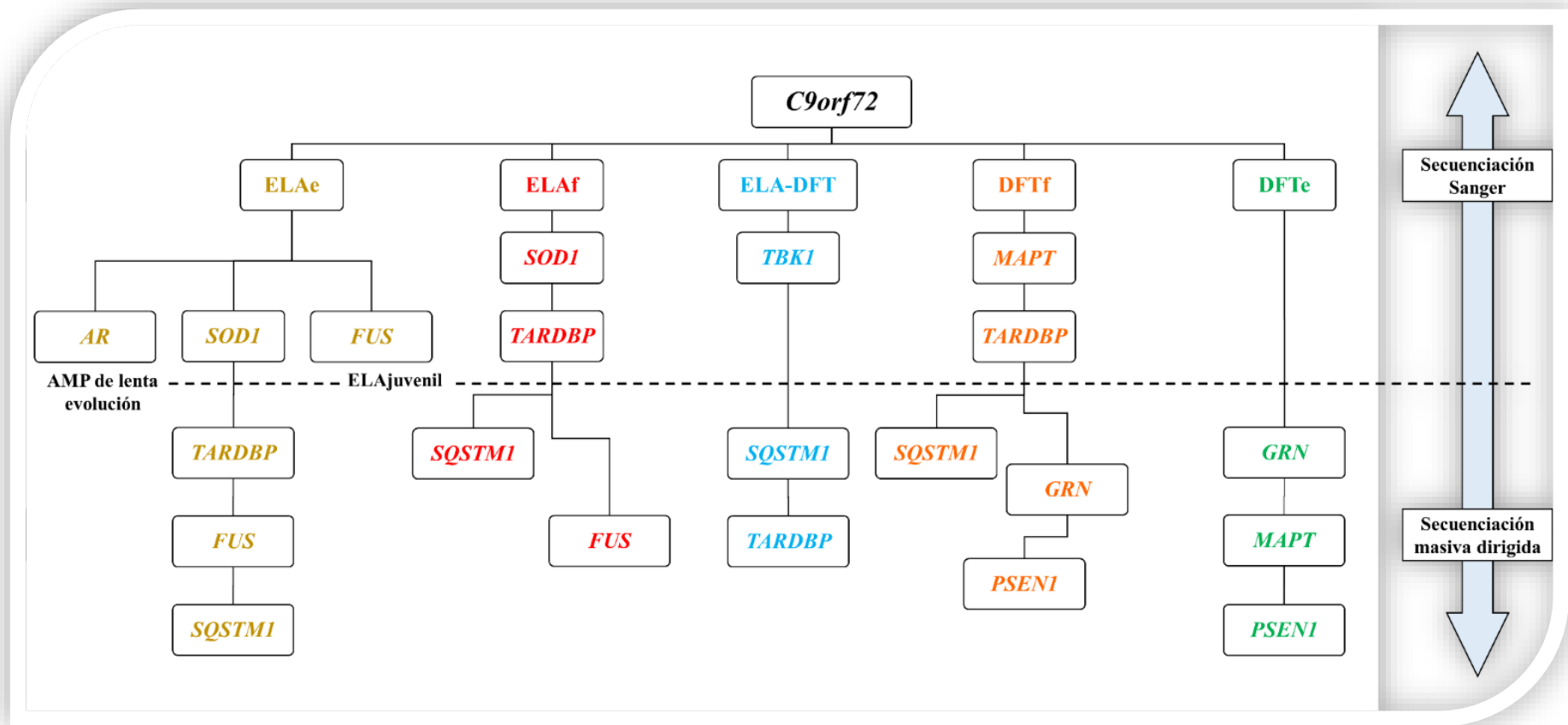


Figura 10. Algoritmo molecular diagnóstico. Jerarquía de actuación en laboratorio para el diagnóstico genético de pacientes con ELA, DFT y pacientes con comorbilidad de ambas patologías. Basado en los resultados obtenidos en el Laboratorio de Investigación en ELA del Instituto de Investigación i+12.



Discusión

1. VALORACIÓN DE LA EXPANSIÓN DE LA REPETICIÓN DE TRINUCLEÓTIDOS EN EL GEN AR COMO FACTOR DE RIESGO DE ELA Y/O DFT

Con la finalidad de encontrar posibles alteraciones moleculares que puedan estar relacionadas con la ELA y, por tanto, ser susceptibles de considerarse un posible factor de riesgo, se ha desarrollado el estudio de la expansión de la repetición “CAG” en el gen *AR*. En este gen se han relacionado un número de repeticiones por encima de 40 con la Atrofia Muscular Espinobulbar (AMEB) o enfermedad de Kennedy (La Spada *et al.*, 1991). Se trata de una enfermedad de neurona motora, que cursa con herencia ligada al sexo recesiva y, que como en otras patologías de origen genético relacionadas con un aumento en el número de codones CAG (codificante por una secuencia de poliQ) se produce una anticipación en el inicio de la enfermedad de generación en generación debido al aumento del número de las citadas repeticiones – enfermedades por repetición de trinucleótidos.

Una de estas patologías en que aparecen poliQ en la secuencia de la proteína afectada es la ataxia cerebelosa. La *SCA2* (*spinocerebelar ataxia type 2* – ataxia espinocerebelosa de tipo 2) posee una expansión del trinucleótido en el gen *ATXN2*. El fenotipo *SCA2* se relaciona con este gen por encima de 34 repeticiones, encontrándose en la población general entre 22 y 26. Se tratan como repeticiones intermedias en *ATXN2* las que se encuentran en el rango 27-33, intervalo que se ha relacionado con el riesgo a padecer ELA (O.R. = 2,80; I.C 95% 1,54–5,12; $p = 3,6 \times 10^{-5}$) (Elden *et al.*, 2010). Sin embargo, en muchos estudios publicados (Daoud *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011; Conforti *et al.*, 2012; Van Langenhove *et al.*, 2012) se considera insuficiente un punto de corte tan bajo, dado el número de controles que poseen longitudes de 27-28, y habiéndose descrito un caso con 32 (Daoud *et al.*, 2011). Si bien es cierto que 32-33 repeticiones también se han relacionado con *SCA2* en casos de inicio excepcionalmente tardío (Cancel *et al.*, 1997; Leggo *et al.*, 1997).

En el presente trabajo se ha estudiado tanto la expansión en el gen *AR* como en *ATXN2*. Para seleccionar los resultados “positivos” en este último gen, se ha optado por un punto de corte de ≥ 30 repeticiones como en uno de los estudios con mayor número de controles y pacientes publicados hasta la fecha (1294 pacientes, más del doble que en el estudio de Elden) (Lee *et al.*, 2011), donde ninguno de sus 679 controles fue portador de una expansión superior a este número. Otros trabajos eligen establecer el límite en ≥ 28 repeticiones (Conforti *et al.*, 2012) con el problema de haber hallado 3 controles internos por encima de ese punto establecido.

Se ha contado con 77 controles debiendo aumentar el número dado el diferente origen de nuestros pacientes respecto a otros estudios. También es relevante señalar que los 6 pacientes con repeticiones ≥ 30 cuentan con una historia familiar previa, 5 de ELA y uno de DFT, ninguna ELA esporádica, frente a estudios previos en que aparecían repeticiones por encima de 30 en 6 casos ELAF

frente a 6 ELAe (Lee *et al.*, 2011). Remarcablemente, se han podido hallar 30 repeticiones en uno de los hermanos de uno de estos casos índice, también afectado de ELA.

Una vez entendida la relación de esta expansión de CAG en *ATXN2* como factor de riesgo, el conocimiento de otras patologías que resultan de expansiones CAG como la enfermedad de Kennedy, los síndromes de X frágil de retraso mental (FRAXA y FRAXE), distrofia miotónica, enfermedad de Huntington y ataxia de Friedreich. Además, sabiendo de la inestabilidad de las expansiones y de su fenómeno de anticipación, se sugiere el estudio de *AR*, en pacientes con ELA y DFT.

La caracterización de pacientes con ELA, DFT y controles para el gen *AR* arroja cierta similitud con *ATXN2*, existiendo cierto alargamiento en los pacientes de ELA respecto de los controles (repeticiones ≥ 31). Cuatro de 323 pacientes con ELA tuvieron repeticiones entre 31 y 34, y ninguno se acerca a los límites de 40 relacionados con la AMEB. El Test Exacto de Fisher de la cohorte estudiada no ha tenido resultados significativos, no estableciéndose relación entre la aparición de una expansión intermedia y el riesgo de padecer ELA. Al igual que en el caso de *ATXN2* se va a aumentar el número de controles y la inclusión de individuos con otras enfermedades neurodegenerativas para mejorar el poder estadístico del estudio.

2. DEMOSTRACIÓN DEL POSIBLE ORIGEN SOMÁTICO DE LA ELA

El origen somático de la ELA ha sido estudiado previamente debido a que se trata una enfermedad del adulto, generalmente esporádica, y tiene una localización muy concreta dentro del SNC (Pamphlett *et al.*, 2011; Pamphlett, Morahan and Yu, 2011; Nordin *et al.*, 2014). Estos trabajos se centran en el estudio de CNVs (variaciones en el número de copias) de genes relacionados con la neurodegeneración comparando muestras de cerebro con sangre (Pamphlett *et al.*, 2011) así como en el estudio de la diferencia de expresión de la ER en *C9orf72* (Dols-Icardo *et al.*, 2014; Nordin *et al.*, 2014). Sin embargo, hasta la fecha, no se han llevado a cabo estudios comparativos de presencia-ausencia de variantes raras en diferentes tejidos en pacientes con ELA.

Los análisis de comparación numérica intertejidos, consistentes en demostrar una posible acumulación de variantes en el tejido afecto analizando el exoma completo (*Tabla 33 de “Resultados”*) y las variantes raras ($MAF < 0,01$) en los genes con mayor implicación en el espectro ELA-DFT (*Tabla 32 de “Resultados”*), no mostraron una diferencia numérica de variantes entre los conjuntos de tejidos. También se intentó averiguar la existencia de variantes comunes en el conjunto de MEs que fuesen poco frecuentes en el de HCs, siendo el resultado igualmente negativo. Finalmente, se realizó el análisis de diferencias intraindividuales, es decir, entre los 3 tejidos de cada paciente. Este análisis mostró la existencia de las mismas variantes raras ($MAF < 0,01$) en los tres tejidos.

Disponer de dos tipos de tejidos procedentes de ectodermo embrionario puede ser muy relevante como control interno de patogenicidad de presencia de variantes. Esto es así dado el carácter

afecto de uno de ellos en todos los pacientes con ELA (médula espinal) mientras que el cerebelo permanece intacto salvo en los pacientes con patología de *C9orf72* que presentan inclusiones positivas para p62 en el mismo (Al-Sarraj *et al.*, 2011).

La hipótesis empleada es la existencia de un evento en una fase temprana de la embriogénesis, debido a que el daño neuronal se encuentra extendido por el SNC. Los resultados muestran las mismas variantes en los 3 tipos de tejidos, apoyando la idea de que no ocurre ningún evento posterior, al menos de origen puntual, en la parte codificante del genoma (WES). Tampoco se pudieron tener en cuenta la presencia de INDELS cuando se analizó el exoma completo debido a la cantidad de artefactos observados en la secuenciación y a la baja cobertura obtenida para los mismos. Por último, sería necesario el estudio de presencia de grandes INDELS (Tabla 43).

Debilidades	Amenazas
<ol style="list-style-type: none"> 1. No valorar grandes INDELS 2. En el análisis 3.2 no tener en cuenta los INDELS debido a la baja cobertura de los mismos 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Baja cobertura de varias regiones del exoma (< 30X) 2. Utilizar plataformas de secuenciación no estandarizadas
Fortalezas	Oportunidades:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Utilizar pacientes caracterizados genéticamente con anterioridad 2. Utilizar tejidos procedentes de 2 capas embrionarias diferentes 3. Utilizar un tejido sano de referencia (cerebelo) procedente de la misma capa embrionaria que el tejido afecto (médula espinal) 4. Utilizar mayor cantidad de casos esporádicos 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Analizar la posibilidad de mosaicismo dentro de la médula espinal (necesidad de coberturas muy altas) 2. Requerir una cobertura mínima de 300X y cobertura media de 500X para evitar zonas mal cubiertas 3. Utilizar arrays CGH para los grandes INDELS

Tabla 43. Diagrama DAFO sobre el estudio realizado ante la hipótesis somática de la ELA.

Queda pendiente el reanálisis de los 27 tríos de tejidos considerando la hipótesis contraria: mutaciones en edad adulta que causen un cambio tardío en el sujeto, emulando los mosaicos típicos de tejidos cancerosos (Freed, Stevens and Pevsner, 2014; Shukla *et al.*, 2015). En contra está el hecho de que hay sujetos portadores de variantes en edad pre-sintomática que desarrollan la enfermedad a posteriori, por lo que la mutación no provoca la enfermedad de manera inmediata. Los casos infantiles hereditarios (Eymard-Pierre *et al.*, 2002) tampoco apoyan la idea de una mutación en edad adulta.

Si bien es cierto que lo más recurrente es pensar que los casos esporádicos pueden tener una base de origen somático y los familiares de origen germinal, en nuestro caso 26 de los 27 sujetos analizados son esporádicos, por lo que tampoco se apoyaría esta idea.

El desarrollo de estudios epigenéticos (Belzil *et al.*, 2013; Marangi and Bryan J. Traynor, 2015b) puede ofrecer otro enfoque sobre el origen incierto de la ELA.

3. PUESTA A PUNTO DE DIFERENTES APROXIMACIONES DE SECUENCIACIÓN MASIVA COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA

La comparación llevada a cabo en el punto 3.3 de resultados muestra una similitud de resultados positivos encontrados a través de las dos técnicas de secuenciación masiva (37'9% en panel

génico, 40,7% en *WES*). Si bien es cierto que queda totalmente sesgada esta comparación debido a que las muestras analizadas mediante *WES* previamente habían sido caracterizadas para el gen *SOD1* en todos los casos, para *TARDBP* en cerca del 50% de los casos e incluso algunos casos también para *FUS*. Por tanto, al eliminar de antemano los casos con mutación en *SOD1* y una considerable cantidad de casos de *TARDBP*, cuyas frecuencias son las mayores tras la ER en *C9orf72*, se está disminuyendo alrededor de un 25-30% de los diagnósticos familiares y en torno a un 2% en los casos esporádicos, según los datos del laboratorio.

Para intentar comparar ambas técnicas de la forma más objetiva posible:

- Se eliminan todas las muestras empleadas en *WES* que previamente tuvieran un diagnóstico genético mediante Sanger (32) así como las variantes en oligogenia halladas en dichas muestras.

- A diferencia de la selección de las muestras realizada para el estudio de *WES*, en que ya se habían estudiado previamente los genes *C9orf72*, *SOD1*, *TARDBP* y *FUS* (y descartados los positivos) en la mayor parte de casos, en la selección del panel se incluyeron sujetos en que no había sido realizado el estudio de *SOD1* y *TARDBP*. Por lo que se eliminan las variantes encontradas en *SOD1* en panel génico y la mitad de las variantes en *TARDBP* (pues aproximadamente el 50% de las muestras del *WES* sí tenían previamente estudiado *TARDBP*) para que los dos estudios puedan ser comparados. De esta manera, la situación cambiaría según la *Tabla 44*:

	Panel génico	Sin sesgar	WES	Sin sesgar
Pacientes analizados	103	97	108	76
Categoría 1	4	1	3	2
Categoría 2	17	14	25	22
Categoría 3	13	12	19	16
Categoría 4	8	8	9	8
Número de variantes	42	35	56	48
Pacientes con variante	39	32	44 ^A	37
Pacientes con oligogenia	3	3	19 ^B	8
% de pacientes con variante	37,9%	33%	40,7%	48,7%

Tabla 44. Modificada de la *Tabla 36* de “*Resultados*”.

Las diferencias se hacen visibles de manera destacada en el % de pacientes con al menos una variante. En este apartado, el % del panel génico disminuye un 5% contrariamente a lo que sucede con el *WES* donde se aumenta en un 8%. Estos datos sí son consistentes con el número de genes analizados mediante ambas técnicas y apoyan la efectividad del exoma frente al panel génico dirigido.

La relación entre la técnica empleada y la posible oligogenia no es significativa (Test exacto de Fisher - F_{ext} ; $p > 0,05$). Sin embargo, al evaluar la relación entre el número de pacientes con variantes encontradas mediante *WES* respecto al panel génico (χ^2), sí es significativo (OR 1,927; IC 95% 1,018 – 3,537; $p = 0,0364$). No se ha encontrado ningún estudio que realice comparación entre dos técnicas de secuenciación masiva dirigido como son el panel génico y el exoma personalizados.

4. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN ESPAÑOLA CON ELA Y/O DFT

La mayor parte de las variantes encontradas mediante las tres técnicas de secuenciación están previamente descritas y relacionadas tanto con ELA como con DFT.

4.1 *C9orf72*

Como ya es conocido, la expansión de la repetición en el intrón 1 de *C9orf72* (Alan E. Renton *et al.*, 2011; DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011) juega un papel muy importante tanto en ELA (45% ELAf, 10% ELAe) como en DFT (30% DFTf, 5% DFTe) (Majounie *et al.*, 2012; van der Zee *et al.*, 2013), siendo el gen con mayor porcentaje de participación en la población española con un 27,1% en ELAf y 3,2% en ELAe (García-Redondo *et al.*, 2013). El porcentaje de aparición de la ER en *C9orf72* disminuye en el Mediterráneo siguiendo un gradiente norte-sur dentro del continente europeo debido al origen fundador finés.

Nuestros resultados aportan datos semejantes en los grupos de ELAf (19,0%) y ELAe (2,1%), no así para DFT donde los porcentajes quedan muy por debajo de lo esperado (0,9% en DFTe, 2,7% en DFTf). Si bien es cierto que hay dos posibles explicaciones: en este estudio se separa como quinto grupo a los pacientes ELA-DFT y el tamaño muestral de los grupos de DFT es bajo, especialmente en DFTf (35 pacientes). Dentro del 10% del grupo ELA-DFT, hay 4 pacientes que inicialmente desarrollaron sintomatología de DFT, 3 de ellos considerados familiares y uno esporádico. De esta manera, los porcentajes de DFT quedarían más elevados. De igual manera ocurre con la ELA, hay 10 pacientes del grupo ELA-DFT que desarrollaron primero sintomatología de neurona motora, de los cuales 7 son familiares y 3 esporádicos. Esta separación que se ha realizado en el presente análisis no se llevó a cabo en los estudios poblacionales previos por lo que los porcentajes aumentarían.

Importante también comentar que 16 de los 58 pacientes portadores de la ER en *C9orf72* tenían alteración cognitiva. Para poder comparar la edad media de inicio de síntomas para los portadores de la expansión, debemos agrupar de igual manera que en la *Tabla 9* de “*Material y Métodos*” todos los pacientes ELAe, ELAf y pacientes ELA-DFT cuyos primeros síntomas fueron de motoneurona. De esta manera, para los 52 pacientes considerados ELA la edad de inicio disminuye de 57,8 a 55,0 años, que replica lo descrito previamente (García-Redondo *et al.*, 2013).

4.2 *SOD1*

Este estudio también representa una aportación especial alrededor de la participación del gen *SOD1* (Rosen *et al.*, 1993) en la ELAf. Las mutaciones en el gen *SOD1* participan en el 20,3% de los casos de ELAf de origen español, un 1,3% más que *C9orf72* y superando estudios anteriormente realizados en España (García-Redondo *et al.*, 2002; Gamez *et al.*, 2006) e Italia (Chiò *et al.*, 2008).

Las variantes en el gen SOD1 en la población española son las siguientes:

Cambio de aa	Patogenicidad	Publicación	Estudio familiar
p.K3E	Patogénica	(Kuźma-Kozakiewicz <i>et al.</i> , 2013)	No - ELA-DFTe
p.V5M	Probablemente patogénica	No descrita	No – ELAe
p.N19S	VUS	(Andersen <i>et al.</i> , 2003)	No disponibles
p.E21G	Patogénica	(Siddique and Deng, 1996)	No disponibles
p.Q22L	Patogénica	(Andersen <i>et al.</i> , 2003)	Cosegregación 1 familia
p.G37R	Patogénica	(Rosen <i>et al.</i> , 1993)	Cosegregación 6 familias
p.E40D	Probablemente patogénica	No descrita	No - ELAe
p.N65S	Patogénica	(García-Redondo <i>et al.</i> , 2002)	Cosegregación 2 familias
p.L84F	Patogénica	No descrita	Cosegregación 2 familias
p.D90A^(F)	Patogénica	(Andersen <i>et al.</i> , 1995)	Cosegregación 1 familia
p.G93S	Patogénica	(Shibata <i>et al.</i> , 1996)	No disponibles
p.L106V	Patogénica	(Rosen <i>et al.</i> , 1993)	Cosegregación 1 familia
p.Del(L106,S107)	Probablemente patogénica	No descrita	Portador en edad pre-sintomática
p.I112T	Patogénica	(Esteban <i>et al.</i> , 1995)	Cosegregación 1 familia
p.I113T	Patogénica	(Rosen <i>et al.</i> , 1993)	Cosegregación 1 familia
p.L117V	Patogénica	(Synofzik <i>et al.</i> , 2012)	Cosegregación 1 familia
p.V119L	VUS	No descrita	No Portadores en edad presintomática
p.L126fsX7	Probablemente patogénica	No descrita	Cosegregación 1 familia
p.N139H	Patogénica	(Nogales-Gadea <i>et al.</i> , 2004)	Cosegregación 3 familias
p.A140=	VUS	(Gamez <i>et al.</i> , 2006)	No - ELAe
p.R143P^C	Probablemente patogénica	No descrita	No - ELAe
p.L144F	Patogénica	(Banci <i>et al.</i> , 2008)	No - ELAe
p.I149T	Probablemente patogénica	No descrita	Cosegregación 1 familia
p.I151T	Patogénica	(Kostrzewa, Damian and Müller, 1996)	Cosegregación 1 familia

Tabla 45. Variantes en *SOD1* encontradas en la población española.

La mutación en *SOD1* con mayor número de casos en nuestro estudio es la p.G37R, siendo además la variante más frecuente en la población española. El cambio de glicina por arginina conlleva un cambio significativo en la polaridad de la proteína. Esta mutación se encuentra localizada en una región de elevada tasa de variabilidad donde ya que se han descrito otras variantes (García-Redondo *et al.*, 2002). Tenemos 6 casos índice distintos localizados en Córdoba y Canarias. Esto indica la importancia de este gen en relación al fenotipo familiar, y una distribución específica de la mutación en áreas geográficas concretas. Esta mutación se caracteriza por presentar penetrancia completa, inicio temprano y una progresión muy lenta de la enfermedad (Rosen *et al.*, 1993). En este caso es aconsejable la realización de un consejo genético adecuado tanto al paciente como a sus familiares.

La mutación p.K3E, fue encontrada en un paciente de origen polaco, siendo precisamente la más frecuente en Polonia (Kuźma-Kozakiewicz *et al.*, 2013). Esto sirve para apoyar la teoría de que las variaciones que se producen en un mismo gen y que provocan ELA son distintas según la región

del mundo por un efecto fundador ancestral (Majounie *et al.*, 2012). De nuevo, ratificando que el origen geográfico también debe marcar una pauta en el laboratorio a la hora de desarrollar un algoritmo diagnóstico apropiado en cada paciente.

Otra mutación relevante es la p.N139H, ya que se trata de la primera mutación registrada en España que presenta una penetrancia incompleta, y el fenotipo en este caso se caracteriza por una supervivencia cercana a los 4 años (Nogales-Gadea *et al.*, 2004). Al contrario de lo que ocurre en el caso anterior, el asesoramiento y estudio genético en estas familias de baja penetrancia podría ser más complejo ya que algunos individuos que portan la mutación podrían permanecer asintomáticos.

Como ya se ha comentado en la Introducción, una excepción notable es la variante p.D90A, que presenta un patrón de herencia recesivo en la población escandinava, pero dominante en el resto del mundo (Andersen *et al.*, 1995; Robberecht and Philips, 2013). Sin embargo, una de nuestras familias muestra el mismo comportamiento representado por el origen escandinavo. Curiosamente está el caso de una paciente con DFT que presenta heterocigosis para esta variante, y cuyo hermano, también portador, presenta algunos rasgos de demencia a pesar de que todavía no está en la edad de inicio del caso índice.

En general, los criterios de patogenicidad para las nuevas variantes encontradas son: cosegregación, conservación en la escala filogenética, cambios en la estructura y funcionalidad de la proteína y ausencia en la población control. Además, es relevante considerar que hasta el momento todos los cambios de un aminoácido por otro que se han descrito en la secuencia de la proteína SOD1 han sido en pacientes con ELA. Las variantes no descritas previamente son:

- La variante p.V5M, en que se produce el cambio de una valina (muy conservada filogenéticamente) por una metionina en el exón 1 del gen, en ambos casos se trata de aminoácidos apolares, capaces de establecer interacciones hidrofóbicas con otros para mantener la estructura terciaria de la proteína, sin embargo, la metionina contiene un átomo de azufre, lo que afecta a la estructura secundaria de la proteína, lo que nos hace pensar que esta variante podría ser patogénica.

- La variante p.L84F, ha sido descrita previamente (Shaw, et al., 1998), pero con un cambio de base en el ADN diferente (c.255G>C) del descrito en este trabajo (c.255G>T), por lo que se considera patogénica. Además, de nuevo se trata de un aminoácido muy conservado.

- La variante E40D, presente en el exón 2, conlleva el cambio de glutamato por aspartato, aminoácidos con misma carga y presentes en la misma proporción en la proteína, por lo que esta variante podría ser patogénica pero con un fenotipo leve, como muestra la evolución de más de 20 años en el caso de este paciente. El glutamato en esta posición no está muy conservado.

- La variante L106_S107del, se produce la delección de dos aminoácidos, una leucina y una serina, en la estructura de la molécula, cambio que puede afectar a su estructura secundaria, y por ende, al resto de la proteína. También se trata de dos aminoácidos muy conservados.

- Por último, la variante p.I149T cosegrega perfectamente en la familia estudiada y los 3 enfermos tienen un inicio temprano (38, 41 y 46 años).

4.3 TARDBP

Continuando con el gen *TARDBP*, tercer gen en participación en este estudio sobre la población española con ELA y/o DFT (*Tabla 46*). Participa en el 4,3% de los casos de ELAf, el 2,7% de la DFTf, 2,5% de ELA-DFT y 0,2% de ELAe.

Cambio de aa	Patogenicidad	Publicación	Estudio familiar
p.G294V	Patogénica	(Del Bo <i>et al.</i> , 2009)	No disponibles
p.G295S	Patogénica	(Corrado <i>et al.</i> , 2009)	No disponibles
p.G298A	Probablemente patogénica	(Deerlin <i>et al.</i> , 2008)	No disponibles
p.N352S	Patogénica	(Kühnlein <i>et al.</i> , 2008)	No disponibles
p.I383V	Patogénica	(Rutherford <i>et al.</i> , 2008)	Cosegregación 1 familia
p.S393L	Patogénica	(Corrado <i>et al.</i> , 2009)	No disponibles

Tabla 46. Variantes en *TARDBP* encontradas en la población española.

La variante de *TARDBP* más común en nuestro estudio es la p.G295S, presente en 2 ELAf, 1 ELAe y 1 ELA-DFT. Especialmente relevante el paciente 1583 que se considera de inicio juvenil y que presenta homocigosis para la mutación p.G295S. Sin embargo, los padres no son portadores de la variante ni están afectados. Una posible opción es que el paciente sea portador de la variante en heterocigosis y una delección en el otro alelo, como en casos previos (Rutherford *et al.*, 2008).

Otro caso de interés es el del paciente 1217 (p.I383V) que presenta DFT sin rasgos de ENM y su hermano, que presenta ELA sin rasgos de DFT. Esta familia ha sido estudiada en profundidad (González-Sánchez *et al.*, 2019).

La única variante de patogenicidad no probada es la p.G298A. Se ha comprobado la patogenicidad de otra variante en el mismo aminoácido (p.G298S) mediante ensayos funcionales (Deerlin *et al.*, 2008) que demuestra que aumenta la localización mitocondrial de TDP-43 mientras que la variante p.G298A presenta una localización similar al fenotipo *wild-type*. Sin embargo, no aparece en las bases de datos poblacionales.

4.4 SQSTM1

El cuarto gen en proporción de pacientes portadores de variantes es *SQSTM1*, participando en los 5 grupos de estudio (*Tabla 47*).

Cambio de aa	Patogenicidad	Publicación	Estudio familiar
p.A33V	Patogénica	(Fecto <i>et al.</i> , 2011)	Estudio pendiente
p.R209C	Probablemente patogénica	No descrita	No disponibles
p.K238E	Probablemente patogénica	(Rubino <i>et al.</i> , 2012)	Estudio pendiente
p.R321C	Patogénica	(Van Der Zee <i>et al.</i> , 2014)	ELAE, DFTe, ELA-DFTe
p.P392L	(Le Ber <i>et al.</i> , 2013) Patogénica	(Le Ber <i>et al.</i> , 2013)	ELA-DFT

Tabla 47. Variantes en *SQSTM1* encontradas en la población española. Estudio pendiente indica la disponibilidad de material genético de un familiar directo pero sin estudio actualmente realizado.

Sobre las variantes encontradas en *SQSTM1* comentar las variantes más comunes en la población con ELA y/o DFT: p.A33V y p.P392L (Fecto *et al.*, 2011; Le Ber *et al.*, 2013; Van Der Zee *et al.*, 2014).

p.A33V ocurre en el dominio de interacción proteína-proteína SH2. Estos dominios son de aproximadamente 100 residuos de longitud y se asocian con residuos de tirosina fosforilados. El cambio de p.A33V puede afectar a la unión y especificidad del ligando de fosfotirosina, lo que puede conducir a una función alterada de p62 en las vías de la proteína tirosina quinasa. De hecho, varias mutaciones en las proteínas del dominio SH2 están asociadas con enfermedades humanas inmunológicas (Lappalainen *et al.*, 2008).

La variante p.P392L fue inicialmente descrita para la enfermedad de Paget (Chung *et al.*, 2008) y posteriormente relacionada con la DFT (Le Ber *et al.*, 2013) en diferentes casos esporádicos y familiares demostrando su cosegregación. En el caso de este estudio, hay un sujeto asintomático que además de esta variante porta la expansión en *C9orf72*, y un paciente ELA-DFT con antecedentes familiares de enfermedad de Alzheimer.

4.5 Otros genes

También es necesario hacer un repaso de algunas variantes previamente descritas en casos más aislados, y halladas en este estudio que son:

Gen	Cambio de aa	Patogenicidad	Publicación
TBK1	p.R573G	Patogénica	(Gómez-Tortosa <i>et al.</i> , 2017)
TBK1	p.T79del	Patogénica	(van der Zee <i>et al.</i> , 2017)
FUS	p.P525L	Patogénica	(Conte <i>et al.</i> , 2012)
MAPT	p.A469T	Factor de riesgo	(Coppola <i>et al.</i> , 2012)

Tabla 48. Variantes previamente descritas en genes minoritarios.

Una de las variantes en *TBK1* (p.R573G) fue descrita y publicada por el grupo de la Dra. Estrella Gómez-Tortosa de la Fundación Jiménez Díaz en colaboración con el Laboratorio de Investigación en ELA. Se trata de una familia peculiar donde 5 miembros tenían diversos fenotipos desde ANFP, EA, DFTvc y ELP y se comprobó la cosegregación perfecta de la variante en los familiares (Gómez-Tortosa *et al.*, 2017).

La variante p.P525L en *FUS* relacionada con pacientes de inicio muy temprano anteriormente (Conte *et al.*, 2012) también estuvo presente en 3 ELAe juveniles de la población analizada.

Asimismo, es necesario señalar la variante p.A469T (p.A152T) en el gen *MAPT* en un paciente con DFTf y otro con ELAf, y que previamente ha sido descrita como factor de riesgo en DFT y EA (Coppola *et al.*, 2012).

Llegados a este punto, es necesario resaltar algunas variantes nuevas en genes recientemente ligados a la ELA y algunos hallazgos curiosos (Tabla 49).

Gen	Cambio de aa	Patogenicidad	Publicación
<i>TBK1</i>	p.K551fsX23	Probablemente patogénica	No descrita
<i>NEK1</i>	p.H769fsX2	Probablemente patogénica	No descrita
<i>KIF5A</i>	p.D1005fsX43	Probablemente patogénica	No descrita
<i>TUBA4A</i>	c.3+2T>G	Probablemente patogénica	No descrita
<i>TUBA4A</i>	p.G95E	Probablemente patogénica	No descrita
<i>CHCHD10</i>	p.P34S	VUS	(Chaussonot <i>et al.</i> , 2014)
<i>CHCHD10</i>	p.P80L	Probablemente patogénica	(Ronchi <i>et al.</i> , 2015)
<i>TREM2</i>	p.R47H	Factor de riesgo	(Cady <i>et al.</i> , 2014)
<i>TREM2</i>	p.R62H	Factor de riesgo	(Del-Aguila <i>et al.</i> , 2019)
<i>MAPT</i>	p.S427F	Factor de riesgo	(Cruchaga <i>et al.</i> , 2012)
<i>SPG7</i>	p.A510V	VUS	(Brugman <i>et al.</i> , 2008)
<i>MAPT + FLNC</i>	p.A469T + p.T302M	Sinergia – factor de riesgo	-
<i>GRN + FLNC</i>	p.V519M + p.G802S	Sinergia – factor de riesgo	(Lee <i>et al.</i> , 2014)

Tabla 49. Nuevas variantes y estudios novedosos.

En primer lugar, las variantes halladas en 3 genes que cursan con mecanismo de haploinsuficiencia, muy recientemente ligados a la ELA: *TBK1*, *NEK1* y *KIF5A*.

La variante p.K551fsX23 encontrada en el presente estudio y previamente no descrita es considerada como probablemente patogénica dado que el mecanismo descrito más común entre las variantes patogénicas en *TBK1* para la ELA y la DFT es precisamente la haploinsuficiencia (Freischmidt *et al.*, 2015).

De igual manera ocurre con la variante de pérdida de función p.H769fsX2 en *NEK1*, cuyo mecanismo está descrito y ligado a la ELA previamente (Kenna *et al.*, 2016). Sin embargo, a pesar de que incluso en otra variante como la p.S1036X (Nguyen *et al.*, 2018) se ha podido comprobar cosegregación en una familia, también se ha comprobado su presencia en el 0,06% de los controles. Por lo que es posible que las variantes de pérdida de función en *NEK1* presenten una penetrancia reducida.

Como tercer variante encontrada bajo el paraguas de un mecanismo de haploinsuficiencia se encuentra uno de los casos más curiosos, el del gen *KIF5A*. Este gen, previamente ligado con CMT2 mediante mutaciones de cambio de aminoácido localizadas principalmente en el dominio motor N-terminal, fue relacionado recientemente con la ELA (Nicolas *et al.*, 2018). Las variantes predominantemente localizadas en pacientes con ELA se encuentran en el dominio motor C-terminal

y en lugar de ser de cambio aminoácido son de pérdida de función. La variante p.D1005fsX43 se localiza en el dominio motor C-terminal y fue hallada en un paciente con ELAf (esta mutación fue encontrada gracias al estudio *WES* tras haber realizado un laboratorio externo privado un análisis mediante panel génico, claramente insuficiente).

Por otro lado, fueron encontradas dos variantes nuevas en el gen *TUBA4A*. La variante de *splicing* p.3+2T>G, encontrada en un paciente ELA-DFTf con HFP de ELA, está localizada en una posición inicial del gen pudiendo provocar un *splicing* alternativo. La variante de cambio aminoacídico p.G95E fue encontrada en un paciente con DFT sin antecedentes familiares. Esto provoca un cambio de polaridad de la proteína, desde un aminoácido apolar (Glicina) a un aminoácido de carga negativa (Glutámico) en una posición altamente conservada en la escala filogenética.

CHCHD10 es un gen que apenas lleva incluido como causal 5 años en la ELA (Bannwarth *et al.*, 2014) añadiendo la posibilidad de un origen mitocondrial de la enfermedad. Una de las variantes con mayor polémica es la p.P34S descrita en la ELA (Chausseot *et al.*, 2014) y que posteriormente se vio presente en una frecuencia elevada en población sana para considerarla patogénica (Perrone *et al.*, 2017). Por otra parte, se encontró la variante p.P80L en un paciente DFTf. Esta es una variante que solo ha sido encontrada una vez en un control, mientras que se detectó en una paciente con DFT (sin mutaciones en otros genes conocidos para la ELA y la DFT) (Perrone *et al.*, 2017), en 2 pacientes con ELA (Zhang *et al.*, 2015) y en 2 pacientes con patología muscular de origen mitocondrial (Ronchi *et al.*, 2015), siendo considerada patogénica en todos los casos. Se incluye la posibilidad de que la penetrancia de p.P80L no sea completa. En un estudio previo en población española no se encontró esta variante en un grupo de 709 pacientes con DFT (Dols-Icardo *et al.*, 2015).

Un hallazgo muy curioso es la presencia de 2 variantes en el gen *TREM2* (p.R47H y p.R62H) en tres pacientes. La variante p.R62H se encontró en 2 DFTf (uno de ellos también posee antecedentes de ELA) y la variante p.R47H en un paciente ELA-DFT con HFP de DFT. Ambas variantes se encuentran descritas previamente como factores de riesgo en EA (Del-Aguila *et al.*, 2019); y posteriormente, la variante p.R47H ha sido asociada como factor de riesgo en ELA (Cady *et al.*, 2014). Esta es una prueba más del solapamiento de la EA con la DFT y a su vez la ELA.

Otro posible factor de riesgo se encuentra en la variante p.S427F del gen *MAPT*, como ya se sugirió (Cruchaga *et al.*, 2012) en casos de Alzheimer. En este estudio se considera la posibilidad de ampliar su efecto como factor de riesgo para DFT puesto que se ha encontrado esta variante en un paciente con DFTe, otro con DFTf y 2 con ELA-DFT también con antecedentes familiares de DFT.

Una variante en el gen *SPG7* con significado muy incierto, es p.A510V. Inicialmente fue descrita como polimorfismo (Brugman *et al.*, 2008) y después en una familia con *HSP* en Inglaterra con cosegregación (McDermott *et al.*, 2001) y posteriormente presente en 13 familias mientras que no aparecía en ninguno de los controles poblacionales (Elleuch *et al.*, 2006). La *HSP* es autosómica

recesiva, por lo que la patogenicidad de la variante no es clara. Sin embargo, la aparición de esta variante en la población con *HSP* es muy significativa (Elleuch *et al.*, 2006). De igual manera, en el presente trabajo aparece en 5 pacientes (2 ELAe, 2 ELAf y 1 DFTf), por lo que podría ser estudiada como posible factor de riesgo en la ELA-DFT.

El caso de las variantes raras encontradas en *FLNC* en pacientes con DFT es de interés debido a un estudio pormenorizado en Bélgica donde se relacionaba la proteína filamina C, proteína específica de músculo, con un papel en la patogénesis de la DFT. Se presentaba la asociación de variantes raras en *FLNC* con niveles elevados de filamina C en el cortex frontal y una enfermedad de evolución más rápida (Janssens *et al.*, 2015). Además, en ese mismo artículo (Janssens *et al.*, 2015) se relacionaron la presencia de variantes en *GRN* y *VCP* junto con variantes raras en *FLNC*. En este trabajo *FLNC* aparece junto a un factor de riesgo conocido en *MAPT* y junto a una variante descrita para la EA en *GRN* (Lee *et al.*, 2014). En el presente trabajo, se incluye la posibilidad de estudiar si ocurre de igual manera con el gen *MAPT*, además de en *GRN* y *VCP*.

5. ANÁLISIS DE LA OLIGOGENIA

Desde hace ya casi 10 años la investigación genética en la ELA ha pasado de buscar únicamente causas monogénicas a plantearse de manera más creciente la posibilidad de una herencia oligogénica. En este trabajo se plantea de la misma forma que en otros (Van Blitterswijk *et al.*, 2012) la búsqueda de variantes adicionales en pacientes con una mutación patogénica previamente hallada en los genes principales de la ELA, tanto en casos familiares como esporádicos. Así pues, se incluyen pacientes con variantes en los genes más representativos de la ELA: *C9orf72*, *SOD1*, *TARDBP* y *FUS*. Dado que 10 de los 32 casos incluidos con mutación previamente conocida aportó una segunda variante de interés, puede ser una metodología muy sugestiva a seguir.

Se han encontrado 24 pacientes y 1 sujeto en edad presintomática (38 años) con posible oligogenia. En resultados se hace referencia a porcentajes del 1,8% del total de los pacientes, 7,8% de pacientes familiares y 0,5% de pacientes esporádicos. Sin embargo, teniendo en cuenta de manera separada a los 211 pacientes que han sido analizados por secuenciación masiva en el Laboratorio de Investigación en ELA del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, que son los únicos datos interpretados de idéntica manera sobre un número elevado de genes, y que por lo tanto son los que pueden dilucidar sobre la base oligogenia de la ELA, los porcentajes cambian de manera notable. Así, se presenta posible herencia oligogénica en el 8,6%, siendo el 78,3% de casos familiares y el 21,7% esporádicos. Teniendo en cuenta que se secuenciaron 106 casos índice familiares y 105 esporádicos, los 18 casos con antecedentes encontrados representan el 17% y los 5 en esporádicos, el 4,8%.

Si bien es cierto que el baremo para incluir variantes raras descritas en la población normal (GnomAD NFE_MAF exome) ha diferido de manera sustancial con otros trabajos previos (Cady *et al.*, 2015) donde incluyen hasta 5 veces la variante p.I2547T en *SETX* que ha sido encontrada en 651

controles sanos (0,5% de la población) y que en el presente proyecto también fue encontrada en varios casos, se sugiere que es una variante benigna. Algunos genes como *SETX* y *SPG11* están generalmente sobrerrepresentados en variantes raras debido en parte a su gran tamaño (*SPG11* tiene un tamaño de 2443 aa, y *SETX*, 2677 aa) por lo que hay que tener especial cuidado en la interpretación de los hallazgos en estos genes. Tampoco se han tenido en cuenta los casos de herencia recesiva o heterocigosis compuesta como herencia oligogénica como sí se han incluido en estudios previos.

Otros estudios relacionan la oligogenia con la presencia de variantes caracterizadas como factores de riesgo adicionales a una variante causal en un gen mayoritario, quizás modificando la penetrancia de una variante o la patogenicidad de la misma (Keogh *et al.*, 2018). En nuestro estudio de la oligogenia aparecen variantes que pueden ser consideradas como posibles factores de riesgo como p.A510V (*SPG7*), p.Y248N (*TMEM106B*) y las 2 de *FLNC* (p.T302M, p.G802S).

Otros factores de riesgo previamente descritos como p.A469T en *MAPT* y repeticiones de tamaño intermedio en *ATXN2* (Elden *et al.*, 2010; Coppola *et al.*, 2012) también son partícipes de 2 y 3 casos de oligogenia, respectivamente.

B4GALNT1 es un gen previamente descrito en relación a la paraparesia espástica hereditaria pero no relacionado con la ELA. Se encontró la misma variante de pérdida de función p.Q120X descrita en homocigosis como causal en *HSP10* (Boukhris *et al.*, 2013) en un paciente portugués. Si bien es cierto que la progresión es mucho más lenta en *HSP*, nosotros detectamos esta mutación en una familia juvenil junto con la mutación p.L106V en *SOD1*, por lo que su significado es incierto. Esta variante no aparece en controles sanos en las bases de datos consultadas.

Otro apunte apreciable es la cantidad de variantes encontradas en *SQSTM1* (6) en conjunción con otros genes. Siendo reseñable su aparición junto a *TBK1*, ER en *C9orf72*, *SOD1* y ER en *ATXN2*.

Para terminar con el estudio de la oligogenia, un estudio muy reciente (Lattante *et al.*, 2019) relaciona variantes en *TBK1* con la aparición de variantes en otros genes previamente conocidos. En este caso se presentan 2 casos de oligogenia con variantes de haploinsuficiencia en *TBK1*, uno de ellos nuevo y otro que fue descrito por la Unidad de Memoria del IIB Sant-Pau de Barcelona (Dols-Icardo *et al.*, 2018) en una de las muestras incluidas en este estudio.

Otra de las teorías sobre la oligogenia es que la acumulación de variantes puede colaborar en una aparición más temprana de la ELA y en una supervivencia menor (Cady *et al.*, 2015). En nuestro caso, únicamente se puede comprobar la tendencia de la edad de inicio (Tabla 50).

La edad de inicio de los 21 pacientes con síntomas de ELA disminuye de 57,5 años a 52,9 años. Aun si elimináramos el paciente con inusual inicio a los 16 años (paciente de Guinea-Bisáu), quedaría en 54,8 años. Sin embargo, se hace inevitablemente necesario aumentar el número de estudios y completar los datos de supervivencia para realizar un estudio comparativo fiable.

Paciente	Clínica	HFP	Edad de inicio
255	ELA	No	25
309	ELA	ELAf	52
446	ELA-DFT	EA	50
1066	ELA-DFT	DFTf	48
1195	ELA-DFT	ELAf / DFTf	61
1241	ELA	ELAf	48
1374	ELA	DFTf	62
1431	ELA	ELAf	72
1771	ELA	No	16
1775	ELA	ELAf	55
1821	DFT-ELA	DFTf	49
1824	ELA	ELAf	42
2074	ELA	No	36
2094	ELA	ELAf	50
2111	ELA-DFT	No	78
2120	ELA	ELAf	55
2165	ELA	ELAf	57
2169	ELA-DFT	ELAf	76
2235	ELA	ELAf	51
2309	ELA-DFT	DFTf	54
2346	ELA	ELAf	75

Tabla 50. Pacientes con síntomas de ELA que presentan oligogenia. Solo se representan los pacientes que han tenido síntomas de ELA inicialmente.

6. DISEÑO DE UN ALGORITMO MOLECULAR DIAGNÓSTICO EN PACIENTES CON ELA Y/O DFT

Como último y gran objetivo diseñado en esta tesis, se considera el diseño de un algoritmo molecular diagnóstico en los distintos subgrupos clínicos que pueden aparecer en un laboratorio de referencia para el diagnóstico genético como es el Laboratorio de Investigación en ELA del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre.

Uno de los conflictos más debatidos en el ámbito del diagnóstico genético en la ELA es la necesidad y el significado del hallazgo de variantes en casos esporádicos. A causa de esto, se plantea en numerosos estudios la necesidad real de análisis genético en los casos con ELAe (Marangi and Bryan J. Traynor, 2015b; Kenna *et al.*, 2016; Turner *et al.*, 2017).

Por otra parte, también hay que tener en cuenta la cantidad de nuevos genes implicados en la ELA que se han descrito por medio de las nuevas tecnologías de secuenciación, especialmente la secuenciación exómica llevada a cabo tanto en ELAe como ELAf (Johnson *et al.*, 2010; Daoud *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2014; Gratten *et al.*, 2017; Nguyen, Van Broeckhoven and van der Zee, 2018).

Sistemáticamente se ha relacionado *C9orf72* con los 5 grupos diferenciados en este trabajo, *SOD1* con la ELAf y ELAe, y *MAPT* en DFTf y DFTe (Al-Chalabi *et al.*, 2012; Renton, Chiò and Traynor, 2014; Guven *et al.*, 2016; Olszewska *et al.*, 2016; Lamp *et al.*, 2018b). De igual manera que en estos estudios, en el diseño de este algoritmo se establece *SOD1* de forma prioritaria en ELAf, aunque dado el número de casos, no así en porcentaje, también se incluye el análisis *SOD1* en ELAe.

Siguiendo con la composición del algoritmo, el hecho de que otros estudios recientes realizados en la población española hayan relacionado la presencia de mutaciones en *TBKI* en un % más frecuente del esperado en pacientes con ELA-DFT (Gómez-Tortosa *et al.*, 2017; van der Zee *et al.*, 2017; Dols-Icardo *et al.*, 2018) ratifica la situación que ocupa su análisis dentro del algoritmo.

De igual manera, hay que resaltar el análisis de dos genes de los que no se suele hacer mucha mención: *FUS* y *AR*. Las mutaciones en *FUS* se encuentran en número destacado de pacientes con ELA esporádica juvenil, como anteriormente también se ha descrito (Bäumer *et al.*, 2010; Chiò, Calvo, *et al.*, 2011; Conte *et al.*, 2012). Incluso, en caso de limitación de recursos en laboratorios más pequeños se podría realizar el análisis prioritario de los exones 5, 6, 13-14 y 15, que albergan prácticamente la totalidad de variantes descritas en este tipo de casos. En cuanto al gen *AR*, muy poco nombrado habitualmente en relación a la ELA, puede ser de gran interés ante diagnósticos clínicos dificultosos donde puede llegar a confundirse una enfermedad de Kennedy con una atrofia muscular progresiva de muy lenta evolución (La Spada *et al.*, 1991; Wijesekera and Leigh, 2009). De hecho, la enfermedad de Kennedy es una de las enfermedades consideradas “ELA-mimética” junto con la neuropatía motora multifocal y la mielopatía cervical espondilótica (Wijesekera and Leigh, 2009). El análisis de este gen, al ser una expansión, resulta accesible a cualquier tipo de laboratorio.

Sorprendentemente, *TARDBP* apareció en mayor medida de lo esperado en casos con ELA familiar, por lo que le damos una relevancia un poco mayor de la que previamente había sido descrita (Sreedharan *et al.*, 2008; Blauwendraat *et al.*, 2018). Además, se incluye su estudio en la DFTf por delante de *SQSTM1* a pesar de contabilizar con un caso menos. Esto es consecuencia de la facilidad de su análisis, ya que más del 95% de las mutaciones descritas en este gen se encuentran en el dominio rico en glicina (exón 6), lo que le confiere una gran ventaja costo-efectiva.

Por el contrario, *SQSTM1*, a pesar de estar partícipe en todos los grupos, aunque de manera algo más representativa en el grupo DFTf, queda relegado a un tercer plano en el algoritmo debido al gran tamaño del gen, la diversidad de la localización en diferentes exones de las variantes descritas y la discutida segregación de las mismas (Fecto *et al.*, 2011; Rubino *et al.*, 2012; Guven *et al.*, 2016). Por esta razón, ya se incluye como primer gen a tener en cuenta en un análisis más exhaustivo llevado a cabo mediante herramientas de investigación y diagnósticas más avanzadas como sería la WES.

Una vez que se pasa al análisis del WES, se incluyen genes que aportan una proporción menor de pacientes en cada grupo, así como los genes *GRN*, *MAPT* y *PSEN1* que son causas ampliamente conocidas en DFT y en casos en los que hay una confusión en el diagnóstico de la EA (Cruchaga *et al.*, 2012; Raux *et al.*, 2012; Guven *et al.*, 2016; Olszewska *et al.*, 2016). De manera obvia e intrínseca al fundamento básico del WES, es necesaria la inclusión del análisis de muchos más genes minoritarios descritos en las patologías de la ELA, la DFT, así como de enfermedades miméticas y enfermedades neurodegenerativas relacionadas en menor grado es en el análisis de la secuenciación masiva (*HSP*, *CMT*, *EA*, *EP*...).

The background of the slide features a complex, abstract network of glowing, fiber-like structures. These structures are primarily blue and white, with some yellow and orange highlights, giving them a luminous, almost ethereal appearance. They resemble a dense web or a network of interconnected lines, possibly representing neural pathways or a complex data structure. The overall effect is one of dynamic energy and interconnectedness.

Conclusiones

1.- La presencia de expansiones intermedias del triplete CAG en el gen *AR* no es un factor de riesgo de ELA ni de DFT. Si bien es necesario aumentar el número de controles y de pacientes con otras enfermedades neurodegenerativas para mejorar la fiabilidad del estudio.

2.- Las expansiones del triplete CAG ≥ 30 en el gen *ATXN2* se relacionan con la presencia de antecedentes familiares en los pacientes con ELA y DFT en la población española.

3.- El origen de la ELA no está ligado a la acumulación de variantes poco frecuentes en genes relacionados con la neurodegeneración en el tejido afecto. No se han encontrado mutaciones somáticas puntuales en el exoma.

4.- El uso de secuenciación Sanger debe empezar a considerarse excepcional en casos familiares. La implementación de la *NGS* como método de rutina es necesaria al menos para el estudio de casos familiares, siendo *WES* la técnica con mayor poder diagnóstico.

5.- Los genes más representativos en la población española de los distintos grupos clínicos son: ELAe (2,1% *C9orf72*, 1,2% *SOD1*), ELAf (20,3% *SOD1*, 19,0% *C9orf72*, 4,3% *TARDBP*), ELA-DFT (10,0% *C9orf72*, *TBK1* 3,3%, 2,5% *TARDBP*), DFTe (0,9% *C9orf72*), DFTf (2,7% *C9orf72*, 8,1% *MAPT*). Las diferencias respecto a otras series se deben al tamaño muestral del grupo ELA-DFT.

6.- El análisis de genes causales de baja frecuencia aumenta en gran medida el porcentaje de pacientes diagnosticados molecularmente en la población española de ELA y DFT. Esto conduce a sugerir estudios de *WES* a todos los casos familiares de ELA y DFT e incluye el grupo de comorbilidad de ambas patologías (ELA-DFT) independientemente de la existencia de antecedentes familiares.

7.- La oligogenia juega un papel secundario en la patogénesis de la ELA. Sin embargo, sí que puede explicar la aparición de la enfermedad en edades más tempranas por la acumulación de variantes en genes considerados factores de riesgo. En la población española se encuentra una posible herencia oligogénica en el 17% de los casos ELAf y 4,8% de ELAe.

COROLARIO

El uso de un algoritmo molecular es necesario en los laboratorios de referencia para el diagnóstico de la ELA, adaptándose al origen geográfico del paciente. Para maximizar el beneficio de cara al enfermo y el costo de laboratorio, es necesario aumentar la centralización de los estudios en laboratorios especializados que tengan la capacidad técnica para afrontar todos los tipos de estudios moleculares necesarios (*WES*, triple PCR, secuenciación Sanger, *MLPA*). La dificultad de interpretación de los estudios de *NGS* hace aún más necesaria la formación de equipos de consejo genético especializados junto a los laboratorios de diagnóstico molecular para ELA y DFT.



Bibliografía

- Abel, O. *et al.* (2013) 'Development of a smartphone app for a genetics website: The amyotrophic lateral sclerosis online genetics database (ALSoD)', *Journal of Medical Internet Research*. doi: 10.2196/mhealth.2706.
- del Aguila, M. A. *et al.* (2003) 'Prognosis in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study.', *Neurology*, 60(5), pp. 813–9. doi: 10.1212/01.WNL.0000049472.47709.3B.
- Akimoto, C. *et al.* (2014) 'A blinded international study on the reliability of genetic testing for GGGGCC-repeat expansions in C9orf72 reveals marked differences in results among 14 laboratories', *Journal of Medical Genetics*, 51(6), pp. 419–424. doi: 10.1136/jmedgenet-2014-102360.
- Al-Chalabi, A. *et al.* (1999) 'Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis', *Human Molecular Genetics*, 8(2), pp. 157–164. doi: 10.1093/hmg/8.2.157.
- Al-Chalabi, A. *et al.* (2012) 'The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis', *Acta Neuropathologica*, 124(3), pp. 339–352. doi: 10.1007/s00401-012-1022-4.
- Al-Chalabi, A. *et al.* (2017) 'July 2017 ENCALS statement on edaravone', *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*. Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group, 18(7–8), pp. 471–474. doi: 10.1080/21678421.2017.1369125.
- Al-Saif, A., Al-Mohanna, F. and Bohlega, S. (2011) 'A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis', *Annals of Neurology*, 70(6), pp. 913–919. doi: 10.1002/ana.22534.
- Al-Sarraj, S. *et al.* (2011) 'P62 positive, TDP-43 negative, neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the cerebellum and hippocampus define the pathology of C9orf72-linked FTLN and MND/ALS', *Acta Neuropathologica*, 122(6), pp. 691–702. doi: 10.1007/s00401-011-0911-2.
- Andersen, P. M. *et al.* (1995) 'Amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for an Asp90Ala mutation in CuZn-superoxide dismutase', *Nature Genetics*, 10(1), pp. 61–66. doi: 10.1038/ng0595-61.
- Andersen, P. M. *et al.* (1997) 'Phenotypic heterogeneity in motor neuron disease patients with CuZn-superoxide dismutase mutations in Scandinavia', *Brain*, 120(10), pp. 1723–1737. doi: 10.1093/brain/120.10.1723.
- Andersen, P. M. *et al.* (2003) 'Sixteen novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene in amyotrophic lateral sclerosis: A decade of discoveries, defects and disputes', *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders*, 4(2), pp. 62–73. doi: 10.1080/14660820310011700.
- Arai, T. *et al.* (2006) 'TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351(3), pp. 602–611. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.10.093.

- Arthur, K. C. *et al.* (2017) 'Use of genetic testing in amyotrophic lateral sclerosis by neurologists', *JAMA Neurology*, 74(1), pp. 125–126. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.4540.
- Baker, M. *et al.* (2006) 'Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17.', *Nature*, 442(7105), pp. 916–919.
- Banci, L. *et al.* (2008) 'SOD1 and amyotrophic lateral sclerosis: Mutations and oligomerization', *PLoS ONE*, 3(2), pp. 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0001677.
- Bannwarth, S. *et al.* (2014) 'A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement', *Brain*, 137(8), pp. 2329–2345. doi: 10.1093/brain/awu138.
- Bäumer, A. *et al.* (2010) 'FUS pathology and FUS mutations characterize juvenile ALS with basophilic inclusions', *Brain Pathology*, 20, p. 35. doi: 10.1111/j.1750-3639.2010.00420.x LK - <http://sfxprd.tau.ac.il:3410/sfxIc141?sid=EMBASE&issn=10156305&id=doi:10.1111%2Fj.1750-3639.2010.00420.x&atitle=FUS+pathology+and+FUS+mutations+characterize+juvenile+ALS+with+basophilic+inclusions&stitle=Brain+Pathol.&title=Brain+Pathology&volume=20&issue=&spage=35&epage=&aulast=Ansorge&aufirst=O.&auinit=O.&aufull=Ansorge+O.&coden=&isbn=&pages=35-&date=2010&auinit1=O&auinitm=>.
- Belzil, V. V. *et al.* (2012) 'Analysis of the SORT1 gene in familial amyotrophic lateral sclerosis', *Neurobiology of Aging*. Elsevier Inc., 33(8), pp. 1845.e7-1845.e9. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.01.011.
- Belzil, V. V. *et al.* (2013) 'Reduced C9orf72 gene expression in c9FTD/ALS is caused by histone trimethylation, an epigenetic event detectable in blood', *Acta Neuropathologica*, 126(6), pp. 895–905. doi: 10.1007/s00401-013-1199-1.
- Bensimon, G. *et al.* (1994) 'A controlled trial of riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis', *The New England journal of medicine*, 330(9), pp. 585–591. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbankfin.2004.11.005>.
- Le Ber, I. *et al.* (2007) 'Progranulin null mutations in both sporadic and familial frontotemporal dementia', *Human Mutation*, 28(9), pp. 846–855. doi: 10.1002/humu.20520.
- Le Ber, I. *et al.* (2013) 'SQSTM1 Mutations in French Patients With Frontotemporal Dementia or Frontotemporal Dementia With Amyotrophic Lateral Sclerosis.', *JAMA neurology*. American Medical Association, 70(11), pp. 1403–1410. Available at: <http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=1738444>.
- Le Ber, I. *et al.* (2014) 'Homozygous TREM2 mutation in a family with atypical frontotemporal dementia', *Neurobiology of Aging*, 35(10), pp. 2419e23-2419e25. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.04.010>.

- Bewley, G. C. (2016) 'Nucleic Acids Research', *Nucleic Acids Research*, 44(1), pp. i–i. doi: 10.1093/nar/gkv1387.
- Bird, T. *et al.* (2003) 'Epidemiology and genetics of frontotemporal dementia/Pick's disease', *Annals of Neurology*, 54(S5), pp. S29–S31. doi: 10.1002/ana.10572.
- Blauwendraat, C. *et al.* (2018) 'The wide genetic landscape of clinical frontotemporal dementia: Systematic combined sequencing of 121 consecutive subjects', *Genetics in Medicine*. Nature Publishing Group, 20(2), pp. 240–249. doi: 10.1038/gim.2017.102.
- Van Blitterswijk, M. *et al.* (2012) 'Evidence for an oligogenic basis of amyotrophic lateral sclerosis', *Human Molecular Genetics*, 21(17), pp. 3776–3784. doi: 10.1093/hmg/dds199.
- Van Blitterswijk, M. *et al.* (2014) 'TMEM106B protects C9ORF72 expansion carriers against frontotemporal dementia', *Acta Neurologica Scandinavica*, 127(3), pp. 397–406. doi: 10.1007/s00401-013-1240-4.
- Del Bo, R. *et al.* (2009) 'TARDBP (TDP-43) sequence analysis in patients with familial and sporadic ALS: Identification of two novel mutations', *European Journal of Neurology*, 16(6), pp. 727–732. doi: 10.1111/j.1468-1331.2009.02574.x.
- van Bogaert, L. (1925) 'Les troubles mentaux dans la sclérose laterale amyotrophique.', *Encéphale*, pp. 27-47. doi: 10.1016/S0035-3787(06)75186-4.
- Borroni, B. *et al.* (2014) 'Heterozygous TREM2 mutations in frontotemporal dementia', *Neurobiology of Aging*. Elsevier Ltd, 35(4), pp. 934.e7-934.e10. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.017.
- Brenner, D. *et al.* (2016) 'NEK1 mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis', *Brain and Nerve*. doi: 10.1093/brain/aww033.
- Brettschneider, J. *et al.* (2012) 'Microglial activation and TDP-43 pathology correlate with executive dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis', *Acta Neuropathologica*, 123(3), pp. 395–407. doi: 10.1007/s00401-011-0932-x.
- Brettschneider, J. *et al.* (2014) 'Sequential distribution of pTDP-43 pathology in behavioral variant frontotemporal dementia (bvFTD)', *Acta Neuropathologica*, 127(3), pp. 423–439. doi: 10.1007/s00401-013-1238-y.
- Brooks, B. R. (1994) 'El escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis', *Journal of the Neurological Sciences*, 124, pp. 96–107. doi: 10.1016/0022-510x(94)90191-0.
- Brooks, B. R. *et al.* (2000) 'El Escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis', *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 1(5), pp. 293–299. doi:

10.1080/146608200300079536.

Broustal, O. *et al.* (2010) 'FUS mutations in frontotemporal lobar degeneration with amyotrophic lateral sclerosis', *J Alzheimers Dis*, 22(3), pp. 765–769. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21158017>.

Brugman, F. *et al.* (2008) 'Paraplegin mutations in sporadic adult-onset upper motor neuron syndromes', *Neurology*, 71(19), pp. 1500–1505. doi: 10.1212/01.wnl.0000319700.11606.21.

Brun, A. (1987) 'Frontal Lobe Degeneration of Non-Alzheimer Type I', *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 4(3–4), pp. 126–131. doi: 10.1159/000107311.

Burrell, J. R. *et al.* (2016) 'The frontotemporal dementia-motor neuron disease continuum', *The Lancet*, 388(10047), pp. 919–931. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00737-6.

Byrne, S. *et al.* (2010) 'Rate of familial amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis.', *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 82(6), pp. 623–627. doi: 10.1136/jnnp.2010.224501.

Byrne, S. *et al.* (2013) 'Aggregation of neurologic and neuropsychiatric disease in ALS kindreds: A population based case controlled cohort study of Familial and Sporadic ALS.', *Annals of neurology*, pp. 1–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23836460>.

Byrne, S. *et al.* (2014) 'Intermediate repeat expansion length in C9orf72 may be pathological in amyotrophic lateral sclerosis', *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 15(1–2), pp. 148–150. doi: 10.3109/21678421.2013.838586.

Cady, J. *et al.* (2014) 'TREM2 variant p.R47H as a risk factor for sporadic amyotrophic lateral sclerosis', *JAMA Neurology*, 71(4), pp. 449–453. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.6237.

Cady, J. *et al.* (2015) 'Amyotrophic lateral sclerosis onset is influenced by the burden of rare variants in known amyotrophic lateral sclerosis genes', *Annals of Neurology*, 77(1), pp. 100–113. doi: 10.1002/ana.24306.

Cancel, G. *et al.* (1997) 'Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia 2: A study of 32 families', *Human Molecular Genetics*, 6(5), pp. 709–715. doi: 10.1093/hmg/6.5.709.

de Carvalho, M. *et al.* (2008) 'Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS', *Clinical Neurophysiology*, 119(3), pp. 497–503. doi: 10.1016/j.clinph.2007.09.143.

Chancello, A. M. and Warlow, C. P. (1992) 'Adult onset motor neuron disease: Worldwide mortality, incidence and distribution since 1950', *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. doi: 10.1136/jnnp.55.12.1106.

Chausseot, A. *et al.* (2014) 'Screening of CHCHD10 in a French cohort confirms the involvement of this gene in frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis patients', *Neurobiology of*

- Aging*, 35(12), pp. 2884.e1-2884.e4. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.022.
- Chen, Y.-Z. *et al.* (2004) 'DNA/RNA Helicase Gene Mutations in a Form of Juvenile Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS4)', *The American Journal of Human Genetics*, 74(6), pp. 1128–1135. doi: 10.1086/421054.
- Chiò, A. *et al.* (2008) 'Prevalence of SOD1 mutations in the Italian ALS population', *Neurology*, 70(7), pp. 533–537. doi: 10.1212/01.wnl.0000299187.90432.3f.
- Chiò, A. *et al.* (2009) 'Prognostic factors in ALS: A critical review', *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 10(5–6), pp. 310–323. doi: 10.3109/17482960802566824.
- Chiò, A., Calvo, A., *et al.* (2011) 'A de novo missense mutation of the FUS gene in a "true" sporadic ALS case', *Neurobiology of Aging*, 32(3), pp. 553:e23-553-e26. doi: doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.016.
- Chiò, A., Borghero, G., *et al.* (2011) 'Large proportion of amyotrophic lateral sclerosis cases in sardinia due to a single founder mutation of the TARDBP gene', *Archives of Neurology*, 68(5), pp. 594–598. doi: 10.1001/archneurol.2010.352.
- Chiò, A. *et al.* (2013) 'Global Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: a Systematic Review of the Published Literature', *Neuroepidemiology*, 41(2), pp. 118–130. doi: 10.1159/000351153.Global.
- Chow, C. Y. *et al.* (2009) 'Deleterious Variants of FIG4, a Phosphoinositide Phosphatase, in Patients with ALS', *American Journal of Human Genetics*, 84(1), pp. 85–88. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.12.010.
- Chung, P. Y. J. *et al.* (2008) 'Founder effect in different european countries for the recurrent P392L SQSTM1 mutation in Paget's disease of bone', *Calcified Tissue International*, 83(1), pp. 34–42. doi: 10.1007/s00223-008-9137-2.
- Cima, V. *et al.* (2009) 'Epidemiology of ALS in Padova district, Italy, from 1992 to 2005', *European Journal of Neurology*. doi: 10.1111/j.1468-1331.2009.02623.x.
- Cirulli, E. T. *et al.* (2015) 'Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways', *Science*. doi: 10.1126/science.aaa3650.
- Colombrita, C. *et al.* (2012) 'TDP-43 and FUS RNA-binding proteins bind distinct sets of cytoplasmic messenger RNAs and differently regulate their post-transcriptional fate in motoneuron-like cells', *Journal of Biological Chemistry*, 287(19), pp. 15635–15647. doi: 10.1074/jbc.M111.333450.
- Conforti, F. L. *et al.* (2012) 'Ataxin-1 and ataxin-2 intermediate-length PolyQ expansions in amyotrophic lateral sclerosis', *Neurology*, 79, pp. 2315–2320.
- Constantinidis, J., Richard, J. and Tissot, R. (1974) 'Pick's Disease. Histological and Clinical

- Correlations', *Europ. Neurol.*, 11, pp. 208–217.
- Conte, A. *et al.* (2012) 'P525L FUS mutation is consistently associated with a severe form of juvenile Amyotrophic Lateral Sclerosis', *Neuromuscular Disorders*. Elsevier B.V., 22(1), pp. 73–75. doi: 10.1016/j.nmd.2011.08.003.
- Coppola, G. *et al.* (2012) 'Evidence for a role of the rare p.A152T variant in mapt in increasing the risk for FTD-spectrum and Alzheimer's diseases', *Human Molecular Genetics*, 21(15), pp. 3500–3512. doi: 10.1093/hmg/dd161.
- Corcia, P. *et al.* (2002) 'Abnormal SMN1 gene copy number is a susceptibility factor for amyotrophic lateral sclerosis', *Annals of Neurology*, 51(2), pp. 243–246. doi: 10.1002/ana.10104.
- Corcia, P. *et al.* (2017) 'Genetics of amyotrophic lateral sclerosis', *Revue Neurologique*. Elsevier Masson SAS, 173(5), pp. 254–262. doi: 10.1016/j.neurol.2017.03.030.
- Corrado, L. *et al.* (2009) 'High frequency of TARDBP gene mutations in italian patients with amyotrophic lateral sclerosis', *Human Mutation*, 30(4), pp. 688–694. doi: 10.1002/humu.20950.
- Couthouis, J. *et al.* (2011) 'A yeast functional screen predicts new candidate ALS disease genes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(52), pp. 20881–90. doi: 10.1073/pnas.1109434108.
- Couthouis, J. *et al.* (2012) 'Evaluating the role of the FUS/TLS-related gene EWSR1 in amyotrophic lateral sclerosis', *Human Molecular Genetics*, 21(13), pp. 2899–2911. doi: 10.1093/hmg/dd116.
- Couthouis, J. *et al.* (2014) 'Targeted Exon Capture and Sequencing in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis', *PLoS Genetics*, 10(10). doi: 10.1371/journal.pgen.1004704.
- Cox, L. E. *et al.* (2010) 'Mutations in CHMP2B in lower motor neuron predominant amyotrophic lateral sclerosis (ALS)', *PLoS ONE*, 5(3). doi: 10.1371/journal.pone.0009872.
- Cozzolino, M. *et al.* (2015) 'Mitochondrial dynamism and the pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(February), pp. 1–5. doi: 10.3389/fncel.2015.00031.
- Crapo, J. D. *et al.* (1992) 'Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells (antioxidant enzyme/peroxlsm/catalase/hnmunocytochemistry)', *Cell Biology*, 89(November), pp. 10405–10409.
- Cruchaga, C. *et al.* (2012) 'Rare variants in APP, PSEN1 and PSEN2 increase risk for AD in late-onset Alzheimer's disease families', *PLoS ONE*, 7(2).
- Cruts, M. *et al.* (2006) 'Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21.', *Nature*, 442(7105), pp. 920–924.
- Cruts, M., Theuns, J. and Van Broeckhoven, C. (2012) 'Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases', *Human Mutation*, 33(9), pp. 1340–1344. doi:

10.1002/humu.22117.

Daoud, H. *et al.* (2011) 'Association of Long ATXN2 CAG Repeat Sizes With Increased Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis', *Archives of Neurology*, 68(6), pp. 739–742.

Daoud, H. *et al.* (2012) 'Exome sequencing reveals SPG11 mutations causing juvenile ALS', *Neurobiology of Aging*. Elsevier Inc., 33(4), pp. 839.e5-839.e9. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.11.012.

Davidson, Y. S. *et al.* (2013) 'Nuclear carrier and RNA Binding Proteins in Frontotemporal Lobar Degeneration associated with Fused in Sarcoma (FUS) pathological changes', 39(2), pp. 157–165. doi: 10.1111/j.1365-2990.2012.01274.x.Nuclear.

Deerlin, V. M. Van *et al.* (2008) 'TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis', *Lancet Neurol*, 7(5), pp. 409–416. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70071-1.TARDBP.

Dejesus-Hernandez, M. *et al.* (2011) 'Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in non-coding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis', *Neuron*, 72(2), pp. 245–256. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.011.Expanded.

DeJesus-Hernandez, M. *et al.* (2011) 'Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS', *Neuron*. Elsevier Inc., 72(2), pp. 245–256. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.011.

Del-Aguila, J. L. *et al.* (2019) 'TREM2 brain transcript-specific studies in AD and TREM2 mutation carriers', *Molecular Neurodegeneration*. Molecular Neurodegeneration, 14(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s13024-019-0319-3.

Delacourte, A. *et al.* (1996) 'Specific Pathological Tau Protein Variants Characterize Pick's Disease', *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 55(2), pp. 159–168.

Deng, H.-X. *et al.* (2011) 'Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia.', *Nature*, 477(7363), pp. 211–215.

Diekstra, F. P. *et al.* (2012) 'UNC13A is a modifier of survival in amyotrophic lateral sclerosis', *Neurobiology of Aging*. Elsevier Inc., 33(3), pp. 630.e3-630.e8. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.10.029.

Dols-Icardo, O. *et al.* (2014) 'Characterization of the repeat expansion size in C9orf72 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia', *Human Molecular Genetics*, 23(3), pp. 749–754. doi: 10.1093/hmg/ddt460.

Dols-Icardo, O. *et al.* (2015) 'Analysis of the CHCHD10 gene in patients with frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis from Spain', *Brain*, 138(12), p. e400. doi:

10.1093/brain/awv175.

Dols-Icardo, O. *et al.* (2016) 'Assessing the role of TUBA4A gene in frontotemporal degeneration', *Neurobiology of Aging*. Elsevier Inc, 38, pp. 215.e13-215.e14. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.10.030.

Dols-Icardo, O. *et al.* (2018) 'Analysis of known amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia genes reveals a substantial genetic burden in patients manifesting both diseases not carrying the C9orf72 expansion mutation', *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 89(2), pp. 162–168. doi: 10.1136/jnnp-2017-316820.

Duquette, A. *et al.* (2005) 'Mutations in senataxin responsible for Quebec cluster of ataxia with neuropathy', *Annals of Neurology*, 57(3), pp. 408–414. doi: 10.1002/ana.20408.

Elden, A. C. *et al.* (2010) 'Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS.', *Nature*, 466(7310), pp. 1069–1075.

Elleuch, N. *et al.* (2006) 'Mutation analysis of the paraplegin gene (SPG7) in patients with hereditary spastic paraplegia', *Neurology*, 66(5), pp. 654–659. doi: 10.1212/01.wnl.0000201185.91110.15.

Van Es, M. A. *et al.* (2009) 'Genome-wide association study identifies 19p13.3 (UNC13A) and 9p21.2 as susceptibility loci for sporadic amyotrophic lateral sclerosis', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 41(10), pp. 1083–1087. doi: 10.1038/ng.442.

Van Es, M. A. *et al.* (2011) 'Angiogenin variants in Parkinson disease and amyotrophic lateral sclerosis', *Annals of Neurology*, pp. 964–973.

Esteban, J. *et al.* (1995) 'Identification of two novel mutations in the gene for Cu Zn superoxide dismutase in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis', *Neuromuscular Disorders*, 5(5), pp. 353–357. doi: 10.1016/0960-8966(95)00007-A.

Eymard-Pierre, E. *et al.* (2002) 'Infantile-Onset Ascending Hereditary Spastic Paralysis Is Associated with Mutations in the Alsin Gene', *The American Journal of Human Genetics*, 71(3), pp. 518–527. doi: 10.1086/342359.

Fang, F. *et al.* (2009) 'Amyotrophic lateral sclerosis in Sweden, 1991-2005', *Archives of Neurology*. doi: 10.1001/archneurol.2009.13.

Fecto, F. *et al.* (2011) 'SQSTM1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis.', *Archives of neurology*, 68(11), pp. 1440–1446. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22708870>.

Fernandes, S. A. *et al.* (2013) 'Oligonucleotide-Based Therapy for FTD/ALS Caused by the', *Journal of Nucleic Acids*, 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/208245>.

Figlewicz, D. a *et al.* (1994) 'Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the

- development of amyotrophic lateral sclerosis', *Human Molecular Genetics*, 3(10), pp. 1757–1761.
- Fogh, I. *et al.* (2014) 'A genome-wide association meta-analysis identifies a novel locus at 17q11.2 associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis', *Human Molecular Genetics*, 23(8), pp. 2220–2231. doi: 10.1093/hmg/ddt587.
- Freed, D., Stevens, E. L. and Pevsner, J. (2014) 'Somatic mosaicism in the human genome', *Genes*, 5(4), pp. 1064–1094. doi: 10.3390/genes5041064.
- Freischmidt, A. *et al.* (2015) 'Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia', *Nature Neuroscience*, 18(5), pp. 631–636. doi: 10.1038/nn.4000.
- Gallo, M. *et al.* (2010) 'Novel MAPT Val75Ala mutation and PSEN2 Arg62His in two siblings with frontotemporal dementia', *Neurological Sciences*, 31(1), pp. 65–70. doi: 10.1007/s10072-009-0132-9.
- Gamez, J. *et al.* (2006) 'Mutational analysis of the Cu/Zn superoxide dismutase gene in a Catalan ALS population: Should all sporadic ALS cases also be screened for SOD1?', *Journal of the Neurological Sciences*, 247(1), pp. 21–28. doi: 10.1016/j.jns.2006.03.006.
- García-Redondo, A. *et al.* (2002) 'Molecular analysis of the superoxide dismutase 1 gene in Spanish patients with sporadic or familial amyotrophic lateral sclerosis', *Muscle and Nerve*, 26(2), pp. 274–278. doi: 10.1002/mus.10193.
- García-Redondo, A. *et al.* (2013) 'Analysis of the C9orf72 Gene in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis in Spain and Different Populations Worldwide', *Human Mutation*, 34(1), pp. 79–82. doi: 10.1002/humu.22211.
- Gass, J. *et al.* (2006) 'Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin-positive frontotemporal lobar degeneration', *Human Molecular Genetics*, 15(20), pp. 2988–3001. doi: 10.1093/hmg/ddl241.
- Gijssels, I. *et al.* (2012) 'A C9orf72 promoter repeat expansion in a Flanders-Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: A gene identification study', *The Lancet Neurology*. Elsevier Ltd, 11(1), pp. 54–65. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70261-7.
- Gitcho, M. a *et al.* (2008) 'TDP-43 A315T Mutation in Familial Motor Neuron Disease', *Neuron*, 63(4), pp. 535–538. doi: 10.1002/ana.21344.TDP-43.
- Goldman, J. S. *et al.* (2005) 'Comparison of family histories in FTLT subtypes and related tauopathies', *Neurology*, 65(11), pp. 1817–1819. doi: 10.1212/01.wnl.0000187068.92184.63.
- Gómez-Tortosa, E. *et al.* (2013) 'C9ORF72 hexanucleotide expansions of 20-22 repeats are associated with frontotemporal deterioration', *Neurology*, 80(4), pp. 366–370. doi: 10.1212/WNL.0b013e31827f08ea.

- Gómez-Tortosa, E. *et al.* (2017) 'Familial primary lateral sclerosis or dementia associated with Arg573Gly TBK1 mutation', *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 88(11), pp. 996–997. doi: 10.1136/jnnp-2016-315250.
- Gomez, C. M. and Das, S. (2014) 'Clinical Exome Sequencing: The New Standard in Genetic Diagnosis', 71(10), pp. 1215–1216. doi: doi:10.1001/jamaneurol.2014.2015.
- González-Sánchez, M. *et al.* (2019) 'TARDBP mutation associated with semantic variant primary progressive aphasia, case report and review of the literature', *Neurocase*. Routledge, 0(0), pp. 1–5. doi: 10.1080/13554794.2019.1581225.
- Gorno-Tempini, M. L. *et al.* (2011) 'Classification of primary progressive aphasia and its variants.', *Neurology*, 76(11), pp. 1006–14. doi: 10.1212/WNL.0b013e31821103e6.
- Govoni, V. *et al.* (2003) 'Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in the local health district of Ferrara, Italy, 1964-1998', *Neuroepidemiology*. doi: 10.1159/000070563.
- Gratten, J. *et al.* (2017) 'Whole-exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis suggests NEK1 is a risk gene in Chinese', *Genome Medicine*, 9(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/s13073-017-0487-0.
- Greenway, M. J. *et al.* (2006) 'ANG mutations segregate with familial and "sporadic" amyotrophic lateral sclerosis', *Nature Genetics*, 38(4), pp. 411–413. doi: 10.1038/ng1742.
- Guerreiro, R. J. *et al.* (2013) 'Using exome sequencing to reveal mutations in TREM2 presenting as a frontotemporal dementia-like syndrome without bone involvement', *Archives of Neurology*, 70(1), pp. 78–84. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.579.
- Güven, G. *et al.* (2016) 'Mutation frequency of the major frontotemporal dementia genes, MAPT, GRN and C9ORF72 in a Turkish cohort of dementia patients', *PLoS ONE*, 11(9), pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0162592.
- Gwinn-Hardy, K. *et al.* (2000) 'Distinctive neuropathology revealed by α -synuclein antibodies in hereditary parkinsonism and dementia linked to chromosome 4p', *Acta Neuropathologica*, 99(6), pp. 663–672. doi: 10.1007/s004010051177.
- Hadano, S. *et al.* (2001) 'A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2', *Nature Genetics*, 29(2), pp. 166–173. doi: 10.1038/ng1001-166.
- Ben Hamida, M., Hentati, F. and Ben Hamida, C. (1990) 'Hereditary motor system diseases (chronic juvenile amyotrophic lateral sclerosis)', *Brain*, 113, pp. 347-363. doi: 10.1093/brain/113.2.347.
- Hardy, J. and Rogaeva, E. (2013) 'Motor neuron disease and frontotemporal dementia: sometimes related, sometimes not', *Experimental Neurology*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.11.006.
- Henkle, K. J. *et al.* (1991) 'Characterization and molecular cloning of a Cu/Zn superoxide dismutase

from the human parasite *Onchocerca volvulus*', *Infection and Immunity*, 59(6), pp. 2063–2069.

Hensman, D. J. *et al.* (2014) 'C9orf72 expansions are the most common genetic cause of Huntington disease phenocopies', *Neurology*, 82(4), pp. 292–299. doi: 10.1212/WNL.0000000000000061.

Hocking, L. J. (2002) 'Domain-specific mutations in sequestosome 1 (SQSTM1) cause familial and sporadic Paget's disease', *Human Molecular Genetics*, 11(22), pp. 2735–2739. doi: 10.1093/hmg/11.22.2735.

Hodges, J. R. *et al.* (2003) 'Survival in frontotemporal dementia', *Neurology*, 61(3), pp. 349–354. doi: 10.1212/01.WNL.0000078928.20107.52.

Hu, W. T. *et al.* (2009) 'Public Access NIH Public Access', *Archives of Neurology*, 66(11), pp. 1359–1364. doi: 10.1371/journal.pone.0178059.

Huey, E. D. *et al.* (2012) 'FUS and TDP43 genetic variability in FTD and CBS', *Neurobiology of Aging*, 33(5).

Hutton, M. *et al.* (1998) 'Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17.', *Nature*, 393(6686), pp. 702–705.

Iida, A. *et al.* (2011) 'Optineurin mutations in Japanese amyotrophic lateral sclerosis', *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 83(2), pp. 233–235. doi: doi:10.1136/jnnp.2010.234963.

Iida, A. *et al.* (2012) 'Novel deletion mutations of OPTN in amyotrophic lateral sclerosis in Japanese', *Neurobiology of Aging*. Elsevier Inc., 33(8), pp. 1843.e19-1843.e24. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.12.037.

Imbert, G. *et al.* (1996) 'Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats', *Nature Genetics*, 14(3), pp. 285–291. doi: 10.1038/ng1196-285.

Ingram, E. M. and Spillantini, M. G. (2002) 'Tau gene mutations: Dissecting the pathogenesis of FTDP-17', *Trends in Molecular Medicine*, 8(12), pp. 555–562. doi: 10.1016/S1471-4914(02)02440-1.

Jang, J. H. *et al.* (2013) 'Analysis of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in Korean patients with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis', *Neurobiology of Aging*. Elsevier Ltd, 34(4), pp. 1311.e7-1311.e9. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.09.004.

Janssens, J. *et al.* (2015) 'Investigating the role of filamin C in Belgian patients with frontotemporal dementia linked to GRN deficiency in FTLTDP brains', *Acta neuropathologica communications*. Acta Neuropathologica Communications, 3, p. 68. doi: 10.1186/s40478-015-0246-7.

Joensen, P. (2012) 'Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in the Faroe Islands', *Acta Neurologica Scandinavica*. doi: 10.1111/j.1600-0404.2011.01611.x.

- Johnson, E. and Kumfor, F. (2018) 'Overcoming apathy in frontotemporal dementia: challenges and future directions', *Current Opinion in Behavioral Sciences*. Elsevier Ltd, 22, pp. 82–89. doi: 10.1016/j.cobeha.2018.01.022.
- Johnson, J. K. *et al.* (2005) 'Frontotemporal lobar degeneration', *Archives of Neurology*, 62, pp. 925–930.
- Johnson, J. O. *et al.* (2010) 'Exome Sequencing Reveals VCP Mutations as a Cause of Familial ALS', *Neuron*, 68(5), pp. 857–864. doi: 10.1016/j.neuron.2010.11.036.
- Johnson, J. O. *et al.* (2014) 'Mutations in the CHCHD10 gene are a common cause of familial amyotrophic lateral sclerosis', *Brain*, 137(12), pp. e311–e311. doi: 10.1093/brain/awu265.
- Johnson, J.O. *et al.* (2014) 'Mutations in the Matrin 3 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis', *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 17(5), pp. 664–666. doi: 10.1038/nn.3688.
- Kabashi, E. *et al.* (2008) 'TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis', *Nature Genetics*, 40(5), pp. 572–574. doi: 10.1038/ng.132.
- Kamada, M. *et al.* (2014) 'Clinicopathologic features of autosomal recessive amyotrophic lateral sclerosis associated with optineurin mutation.', *Neuropathology: official journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 34(1), pp. 64–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23889540>.
- Kaneb, H. M. *et al.* (2015) 'Deleterious mutations in the essential mRNA metabolism factor, hGle1, in amyotrophic lateral sclerosis', *Human Molecular Genetics*, 24(5), pp. 1363–1373. doi: 10.1093/hmg/ddu545.
- Kawamata, J. *et al.* (1997) 'Novel G16S (GGC- AGC) mutation in the SOD1 gene in a patient with apparently sporadic young- onset amyotrophic lateral sclerosis', *Human Mutation*, 9(4), pp. 356–358. doi: 10.1002/(sici)1098-1004(1997)9:4<356::aid-humu9>3.3.co;2-3.
- Kenna, K. P. *et al.* (2016) 'NEK1 variants confer susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis', *Nature Genetics*, 48(9), pp. 1037–1042. doi: doi:10.1038/ng.3626.
- Keogh, M. J. *et al.* (2018) 'Oligogenic genetic variation of neurodegenerative disease genes in 980 postmortem human brains', *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 89(8), pp. 813–816. doi: 10.1136/jnnp-2017-317234.
- Kertesz, A. (2003) 'Pick Complex: An Integrative Approach to Frontotemporal Dementia - Primary Progressive Aphasia, Corticobasal Degeneration, and Progressive Supranuclear Palsy', *Neurologist*, 9(6), pp. 311–317. doi: 10.1097/01.nrl.0000094943.84390.cf.
- Kim, H. J. *et al.* (2013) 'Prion-like domain mutations in hnRNPs cause multisystem proteinopathy and ALS', *NIH public access*, 495(7442), pp. 467–473. doi: 10.1038/nature11922.Prion-like.

- Knopman, D. S. *et al.* (1990) 'Dementia lacking distinctive histologic features: a common non-Alzheimer degenerative dementia.', *Neurology*, 40(2), pp. 251–6. doi: 10.1212/wnl.40.2.251.
- Kobayashi, H. *et al.* (2011) 'Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement', *American Journal of Human Genetics*. The American Society of Human Genetics, 89(1), pp. 121–130. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.05.015.
- Kostrzewa, M., Damian, M. S. and Müller, U. (1996) 'Superoxide dismutase 1: Identification of a novel mutation in a case of familial amyotrophic lateral sclerosis', *Human Genetics*, 98(1), pp. 48–50. doi: 10.1007/s004390050157.
- Krüger, S. *et al.* (2016) 'Rare Variants in Neurodegeneration Associated Genes Revealed by Targeted Panel Sequencing in a German ALS Cohort', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9(92). doi: 10.3389/fnmol.2016.00092.
- Kühnlein, P. *et al.* (2008) 'Two German Kindreds with Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis due to TARDBP Mutations', *Archives of Neurology*, 65(9), pp. 1185–1189. doi: 10.1001/archneur.65.9.1185.
- Kuźma-Kozakiewicz, M. *et al.* (2013) 'Recurrent K3E mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene associated with amyotrophic lateral sclerosis', *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 14(7–8), pp. 608–614. doi: 10.3109/21678421.2013.812119.
- Kwiatkowski, T. J. *et al.* (2009) 'Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis.', *Science (New York, N.Y.)*, 323(5918), pp. 1205–1208. doi: 10.1126/science.1166066.
- Laaksovirta, H. *et al.* (2010) 'Chromosome 9p21 in amyotrophic lateral sclerosis in Finland: A genome-wide association study', *The Lancet Neurology*, 9(10), pp. 978–985. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70184-8.
- Lacomblez, L. *et al.* (1996) 'Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis', *Lancet*, 347(9013), pp. 1425–1431. doi: 10.1016/S0140-6736(96)91680-3.
- Lamp, M. *et al.* (2018a) 'Twenty years of molecular analyses in amyotrophic lateral sclerosis: genetic landscape of Italian patients', *Neurobiology of Aging*. Elsevier Inc., 66, pp. 179.e5-179.e16. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.01.013.
- Lamp, M. *et al.* (2018b) 'Twenty years of molecular analyses in amyotrophic lateral sclerosis: genetic landscape of Italian patients', *Neurobiology of Aging*. Elsevier Inc, 66, pp. 179.e5-179.e16. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.01.013.
- Van Langenhove, T. *et al.* (2010) 'Genetic contribution of FUS to frontotemporal lobar degeneration', *Neurology*, 74(5), pp. 366–371.

- Van Langenhove, T. *et al.* (2012) 'Ataxin-2 polyQ expansions in FTL-D-ALS spectrum disorders in Flanders-Belgian cohorts', *Neurobiology of Aging*. Elsevier Inc., 33(5), pp. 1004.e17-1004.e20. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.09.025.
- Lappalainen, I. *et al.* (2008) 'Genome wide analysis of pathogenic SH2 domain mutations', *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 72(2), pp. 779–792. doi: 10.1002/prot.21970.
- Lashley, T. *et al.* (2011) 'A comparative clinical, pathological, biochemical and genetic study of fused in sarcoma proteinopathies', *Brain*, 134(9), pp. 2548–2564. doi: 10.1093/brain/awr160.
- Lattante, S. *et al.* (2019) 'Coexistence of variants in TBK1 and in other ALS-related genes elucidates an oligogenic model of pathogenesis in sporadic ALS', *Neurobiology of Aging*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2019.03.010.
- Lattante, S., Rouleau, G. A. and Kabashi, E. (2013) 'TARDBP and FUS Mutations Associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis: Summary and Update', *Human Mutation*, 34(6), pp. 812–826. doi: 10.1002/humu.22319.
- Lee, B. J. *et al.* (2006) 'Rules for Nuclear Localization Sequence Recognition by KaryopherinB2', *Cell*, 126(3), pp. 543–558. doi: doi:10.1016/j.cell.2006.05.049.
- Lee, G. and Leugers, C. J. (2013) 'Tau and Tauopathies', *Prog Mol Biol Transl Sci.*, 107, pp. 263–293. doi: 10.1016/B978-0-12-385883-2.00004-7.Tau.
- Lee, J. H. *et al.* (2014) 'Disease-related mutations among caribbean hispanics with familial dementia', *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, 2(5), pp. 430–437. doi: 10.1002/mgg3.85.
- Lee, T. *et al.* (2011) 'Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions in European ALS patients', *Human Molecular Genetics*, 20(9), pp. 1697–1700. doi: 10.1093/hmg/ddr045.
- De Leeuw, C. (2008) 'CMT4J: Charcot-Marie-Tooth disorder caused by mutations in FIG4', *Clinical Genetics*, 73(4), pp. 318–319. doi: 10.1111/j.1399-0004.2008.00962_3.x.
- Leggo, J. *et al.* (1997) 'Analysis of spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6, dentatorubral-pallidoluysian atrophy, and Friedreich's ataxia genes in spinocerebellar ataxia patients in the UK', *Journal of Medical Genetics*, 34(12), pp. 982–985.
- Lenk, G. M. *et al.* (2011) 'Pathogenic mechanism of the FIG4 mutation responsible for charcot-marie-tooth disease CMT4J', *PLoS Genetics*, 7(6). doi: 10.1371/journal.pgen.1002104.
- Levanon, D. *et al.* (1985) 'Architecture and anatomy of the chromosomal locus in human chromosome 21 encoding the Cu/Zn superoxide dismutase.', *The EMBO Journal*, 4(1), pp. 77–84. doi: 10.1002/j.1460-2075.1985.tb02320.x.
- Li, H. *et al.* (2009) 'The Sequence Alignment/Map format and SAMtools', *Bioinformatics*, 25(16), pp. 2078–2079. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352.

- Li, H. and Durbin, R. (2010) 'Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform', *Bioinformatics*, 26(5), pp. 589–595. doi: 10.1093/bioinformatics/btp698.
- Li, Q. and Wang, K. (2017) 'InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines', *American Journal of Human Genetics*. Elsevier Company., 100(2), pp. 267–280. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.01.004.
- Ling, S.-C., Polymenidou, M. and Cleveland, D. W. (2013) 'Converging mechanisms in ALS and FTD: Disrupted RNA and protein homeostasis', *Neuron*, 79(3), pp. 416–438. doi: 10.1016/j.neuron.2013.04.008.
- Logroscino, G. *et al.* (2011) 'Incidence of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Europe', *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 81(4), pp. 385–390. doi: 10.1136/jnnp.2009.183525.Incidence.
- Lomen-Hoerth, C., Anderson, T. and Miller, B. (2002) 'The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia', *Neurology*, 59(7), pp. 1077–1079. doi: 10.1212/WNL.59.7.1077.
- Mackenzie, I. R. A. *et al.* (2007) 'Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations', *Annals of Neurology*, 61(5), pp. 427–434. doi: 10.1002/ana.21147.
- Mackenzie, I. R. A. and Neumann, M. (2016) 'Molecular neuropathology of frontotemporal dementia: insights into disease mechanisms from postmortem studies', *Journal of Neurochemistry*, 138, pp. 54–70. doi: 10.1111/jnc.13588.
- Mackenzie, I. R. A. and Rademakers, R. (2007) 'The molecular genetics and neuropathology of frontotemporal lobar degeneration: Recent developments', *Neurogenetics*. doi: 10.1007/s10048-007-0102-4.
- Mackenzie, I. R. A., Rademakers, R. and Neumann, M. (2010) 'TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia', *The Lancet Neurology*, pp. 995–1007.
- Mahoney, C. J. *et al.* (2012) 'Frontotemporal dementia with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: Clinical, neuroanatomical and neuropathological features', *Brain*, 135(3), pp. 736–750. doi: 10.1093/brain/awr361.
- Majounie, E. *et al.* (2012) 'Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: A cross-sectional study', *The Lancet Neurology*. Elsevier Ltd, 11(4), pp. 323–330. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70043-1.
- Marangi, G. and Traynor, Bryan J. (2015a) 'Genetic causes of amyotrophic lateral sclerosis: New genetic analysis methodologies entailing new opportunities and challenges', *Brain Research*, pp. 75–93. doi: 10.1016/j.brainres.2014.10.009.

- Marangi, G. and Traynor, Bryan J. (2015b) 'Genetic causes of amyotrophic lateral sclerosis: New genetic analysis methodologies entailing new opportunities and challenges', *Brain Research*. Elsevier, 1607(2015), pp. 75–93. doi: 10.1016/j.brainres.2014.10.009.
- Marangi, G. and Traynor, Bryan J (2015) 'Genetic cause of amyotrophic lateral sclerosis: new genetic analysis methodologies entailing new opportunities and challenges', *Brain Research*, 1607, pp. 75–93. doi: 10.1016/j.brainres.2014.10.009.Genetic.
- Maruyama, H. *et al.* (2010) 'Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis.', *Nature*, 465(7295), pp. 223–226.
- McCord JM and Fridovich I (1969) 'An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (Hemocuprein)*', *The Journal of Biological Chemistry*, 244(22), pp. 6049–6055. doi: 10.1016/B978-0-12-415760-6.00001-5.
- McDermott, C. J. *et al.* (2001) 'Paraplegin gene analysis in hereditary spastic paraparesis (HSP) pedigrees in northeast England', *Neurology*, 56(4), pp. 467–471. doi: 10.1212/WNL.56.4.467.
- McKhann, G. M. *et al.* (2001) 'Clinical and Pathological Diagnosis of Frontotemporal Dementia', *Archives of Neurology*, 58(11), p. 1803. doi: 10.1001/archneur.58.11.1803.
- Mendez, M. F. and McMurtry, A. (2006) 'Frontotemporal Dementia-like Phenotypes Associated With Presenilin-1 Mutations', *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias*, 21(4), pp. 281–286.
- Mercy, L. *et al.* (2008) 'Incidence of early-onset dementias in Cambridgeshire, United Kingdom', *Neurology*, 71(19), pp. 1496–1499.
- Meyer, T. *et al.* (2005) 'Juvenile ALS with long-term survival associated with spastin gene mutation', *Neurology*, 65, pp. 141–143. doi: 10.1212/01.wnl.0000167130.31618.0a.
- Miller, T. *et al.* (2013) 'A Phase I, Randomised, First-in-Human Study of an Antisense Oligonucleotide Directed Against SOD1 Delivered Intrathecally in SOD1-Familial ALS Patients', *Lancet Neurol*, 12(5), pp. 435–442. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70061-9.
- Mitchell, J. *et al.* (2010) 'Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(16), pp. 7556–7561. doi: 10.1073/pnas.0914128107.
- Miyatake, S. and Matsumoto, N. (2014) 'Genetics: Clinical exome sequencing in neurology practice', *Nature Reviews Neurology*. Nature Publishing Group, 10(12), pp. 676–678. doi: 10.1038/nrneurol.2014.213.
- Mizusawa, H. *et al.* (1989) 'Focal accumulation of phosphorylated neurofilaments within anterior horn cell in familial amyotrophic lateral sclerosis.', *Acta neuropathologica*, 79(1), pp. 37–43.

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2511732> (Accessed: 20 July 2019).

Mok, K., Koutsis, G., *et al.* (2012) 'High frequency of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat in familial and sporadic Greek ALS patients', *Neurobiology of Aging*. Elsevier Inc., 33(8), pp. 1851.e1-1851.e5. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.02.021.

Mok, K., Traynor, B. J., *et al.* (2012) 'The chromosome 9 ALS and FTD locus is probably derived from a single founder', *Neurobiology of Aging*. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.08.005.

Moreira, M. C. *et al.* (2004) 'Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2', *Nature Genetics*, 36(3), pp. 225–227. doi: 10.1038/ng1303.

Morgan, S. *et al.* (2017) 'A comprehensive analysis of rare genetic variation in amyotrophic lateral sclerosis in the UK', *Brain*, 140(6). doi: 10.1093/brain/awx082.

Muller, K. *et al.* (2014) 'Two novel mutations in conserved codons indicate that CHCHD10 is a gene associated with motor neuron disease', *Brain*, 137(12), pp. e309–e309. doi: 10.1093/brain/awu227.

Murray, M. E. *et al.* (2011) 'Clinical and neuropathologic heterogeneity of c9FTD/ALS associated with hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72', *Acta Neuropathologica*, 122(6), pp. 673–690. doi: 10.1007/s00401-011-0907-y.

Nalbandian, A. *et al.* (2011) 'The multiple faces of valosin-containing protein-associated diseases: Inclusion body myopathy with Paget's disease of bone, frontotemporal dementia, and amyotrophic lateral sclerosis', *Journal of Molecular Neuroscience*, 45(3), pp. 522–531. doi: 10.1007/s12031-011-9627-y.

Neary, D. *et al.* (1998) 'FTD A consensus on clinical diagnostic criteria', *Neurology*, 51(6), pp. 1546–1554. doi: 10.1212/WNL.51.6.1546.

Neumann, M. *et al.* (2006) 'Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis', *Science*, 314(5796), pp. 130–133. doi: 10.1126/science.1134108.

Neumann, M. *et al.* (2009) 'A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology', *Brain*, 132(11), pp. 2922–2931. doi: 10.1093/brain/awp214.

Neumann, M. *et al.* (2011) 'FET proteins TAF15 and EWS are selective markers that distinguish FTLD with FUS pathology from amyotrophic lateral sclerosis with FUS mutations', *Brain*, 134(9), pp. 2595–2609. doi: 10.1093/brain/awr201.

Ng, L., Talman, P. and Khan, F. (2011) 'Motor neurone disease: Disability profile and service needs in an Australian cohort', *International Journal of Rehabilitation Research*, 34(2), pp. 151–159. doi: 10.1097/MRR.0b013e328344ae1f.

Nguyen, H. P. *et al.* (2018) 'NEK1 genetic variability in a Belgian cohort of ALS and ALS-FTD patients', *Neurobiology of Aging*. Elsevier Inc, 61(August), pp. 255.e1-255.e7. doi:

10.1016/j.neurobiolaging.2017.08.021.

Nguyen, H. P., Van Broeckhoven, C. and van der Zee, J. (2018) 'ALS Genes in the Genomic Era and their Implications for FTD', *Trends in Genetics*. Elsevier Ltd, 34(6), pp. 404–423. doi: 10.1016/j.tig.2018.03.001.

Nicolas, A. *et al.* (2018) 'Genome-wide Analyses Identify KIF5A as a Novel ALS Gene', *Neuron*, 97(6), pp. 1268–1283. doi: 10.1016/j.neuron.2018.02.027.

Nishimura, A. L. *et al.* (2004) 'A Mutation in the Vesicle-Trafficking Protein VAPB Causes Late-Onset Spinal Muscular Atrophy and Amyotrophic Lateral Sclerosis', *The American Journal of Human Genetics*, 75(5), pp. 822–831. doi: 10.1086/425287.

Nogales-Gadea, G. *et al.* (2004) 'A novel exon 5 mutation (N139H) in the SOD1 gene in a Spanish family associated with incomplete penetrance', *Journal of the Neurological Sciences*, 219(1–2), pp. 1–6.

Nordin, A. *et al.* (2014) 'Extensive size variability of the GGGGCC expansion in C9orf72 in both neuronal and non-neuronal tissues in 18 patients with ALS or FTD', *Human Molecular Genetics*, 24(11), pp. 3133–3142. doi: 10.1093/hmg/ddv064.

Nunnemann, S. *et al.* (2011) 'Survival in a German population with frontotemporal lobar degeneration', *Neuroepidemiology*, 37(3–4), pp. 160–165. doi: 10.1159/000331485.

O'Toole, O. *et al.* (2008) 'Epidemiology and clinical features of amyotrophic lateral sclerosis in Ireland between 1995 and 2004', *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 79(1), pp. 30–32. doi: 10.1136/jnnp.2007.117788.

Olszewska, D. A. *et al.* (2016) 'Genetics of Frontotemporal Dementia', *Current Neurology and Neuroscience Reports*. Current Neurology and Neuroscience Reports, 16(12). doi: 10.1007/s11910-016-0707-9.

Onyike, C. U. and Diehl-Schmid, J. (2013) 'The epidemiology of frontotemporal dementia', *International Review of Psychiatry*, 25(2), pp. 130–137. doi: 10.3109/09540261.2013.776523.

Orlacchio, A. *et al.* (2010) 'SPATACSIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis', *Brain*, 133(2), pp. 591–598. doi: 10.1093/brain/awp325.

Padovani, A. *et al.* (2007) 'Extrapyramidal symptoms in Frontotemporal Dementia: Prevalence and clinical correlations', *Neuroscience Letters*, 422(1), pp. 39–42. doi: 10.1016/j.neulet.2007.05.049.

Pamphlett, R. *et al.* (2011) 'Looking for differences in copy number between blood and brain in sporadic amyotrophic lateral sclerosis', *Muscle and Nerve*, 44(4), pp. 492–498. doi: 10.1002/mus.22095.

Pamphlett, R., Morahan, J. M. and Yu, B. (2011) 'Using case-parent trios to look for rare de novo

genetic variants in adult-onset neurodegenerative diseases', *Journal of Neuroscience Methods*. Elsevier B.V., 197(2), pp. 297–301. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.02.028.

Pang, S. Y. Y., Hsu, J. S., *et al.* (2017) 'Burden of rare variants in ALS genes influences survival in familial and sporadic ALS', *Neurobiology of Aging*. Elsevier Ltd, 58, pp. 238.e9-238.e15. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.06.007.

Pang, S. Y. Y., Teo, K. C., *et al.* (2017) 'The role of gene variants in the pathogenesis of neurodegenerative disorders as revealed by next generation sequencing studies: A review', *Translational Neurodegeneration*. Translational Neurodegeneration, 6(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s40035-017-0098-0.

Parkinson, N. *et al.* (2006) 'ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B)', *Neurology*, 67(6), pp. 1074–1077. doi: 10.1212/01.wnl.0000231510.89311.8b.

Pensato, V. *et al.* (2015) 'TUBA4A gene analysis in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: identification of novel mutations', *Journal of Neurology*, 262(5), pp. 1376–1378. doi: 10.1007/s00415-015-7739-y.

Perl-Treves, R. *et al.* (1988) 'Isolation of two cDNA clones from tomato containing two different superoxide dismutase sequences', *Plant Molecular Biology*, 11(5), pp. 609–623. doi: 10.1007/BF00017461.

Perrone, F. *et al.* (2017) 'Investigating the role of ALS genes CHCHD10 and TUBA4A in Belgian FTD-ALS spectrum patients', *Neurobiology of Aging*, 51. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.12.008.

Puls, I. *et al.* (2003) 'Mutant dynactin in motor neuron disease', *Nature Genetics*, 33(4), pp. 455–456. doi: 10.1038/ng1123.

Rascovsky, K. *et al.* (2011) 'Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia.', *Brain: a journal of neurology*, 134(Pt 9), pp. 2456–77. doi: 10.1093/brain/awr179.

Raux, G. *et al.* (2012) 'Dementia with prominent frontotemporal features associated with L113P presenilin 1 mutation', *Neurology*, 55(10), pp. 1577–1579. doi: 10.1212/wnl.55.10.1577.

Renton, A., Chiò, A. and Traynor, B. J. (2014) 'State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics.', *Nature neuroscience*. Nature Publishing Group, 17(1), pp. 17–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24369373>.

Renton, Alan E *et al.* (2011) 'A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD.', *Neuron*, 72(2), pp. 257–68. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.010.

- Renton, Alan E. *et al.* (2011) 'A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD', *Neuron*, 72(2), pp. 257–268. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.010.
- Rezaie, T. *et al.* (2002) 'Adult-Onset Primary Open-Angle Glaucoma Caused by Mutations in Optineurin — Supplemental Data', *Science*, 295(February), pp. 1077–1079. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/295/5557/1077/suppl/DC1>.
- Van Rheenen, W. *et al.* (2016) 'Genome-wide association analyses identify new risk variants and the genetic architecture of amyotrophic lateral sclerosis', *Nature Genetics*, 48(9). doi: 10.1038/ng.3622.
- Riviere, M. *et al.* (1998) 'An analysis of extended survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis treated with riluzole', *Archives of Neurology*, 55(4), pp. 526–528. doi: 10.1001/archneur.55.4.526.
- Robberecht, W. *et al.* (1996) 'Heterozygosity for the D90A mutation in the superoxide dismutase gene is associated with familial and apparently sporadic amyotrophic lateral sclerosis', *Neurology*, 46(2), p. 5020.
- Robberecht, W. and Philips, T. (2013) 'The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis', *Nature neuroscience*, (Review), pp. 248–264. Available at: www.nature.com/reviews/neuro.
- Roberson, E. D. *et al.* (2005) 'Frontotemporal dementia progresses to death faster than Alzheimer disease', *Neurology*, 65(5), pp. 719–725. doi: 10.1212/01.wnl.0000173837.82820.9f.
- Rohrer, J. D. *et al.* (2015) 'C9orf72 expansions in frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis', *The Lancet Neurology*. Elsevier Ltd, 14(3), pp. 291–301. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70233-9.
- Rohrer, J. D. and Warren, J. D. (2011) 'Phenotypic signatures of genetic frontotemporal dementia', *Current Opinion in Neurology*, 24(6), pp. 542–549. doi: 10.1097/WCO.0b013e32834cd442.
- Ronchi, D. *et al.* (2015) 'CHCHD10 mutations in Italian patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis', *Brain*, 138(8), p. e372. doi: 10.1093/brain/awu384.
- Rosen, D. R. *et al.* (1993) 'Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis.', *Nature*, 362(6415), pp. 59–62. doi: 10.1038/362059a0.
- Rosso, S. M. *et al.* (2003) 'Frontotemporal dementia in The Netherlands: Patient characteristics and prevalence estimates from a population-based study', *Brain*, 126(9), pp. 2016–2022. doi: 10.1093/brain/awg204.
- Rosor, M. N. *et al.* (2000) 'Semantic dementia with ubiquitin-positive tau-negative inclusion bodies', *Brain*, 123(2), pp. 267–276. doi: 10.1093/brain/123.2.267.
- Rubino, E. *et al.* (2012) 'SQSTM1 mutations in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic

- lateral sclerosis.’, *Neurology*, 79(15), pp. 1556–62. doi: 10.1212/WNL.0b013e31826e25df.
- Rutherford, N. J. *et al.* (2008) ‘Novel mutations in TARDBP(TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis’, *PLoS Genetics*, 4(9), pp. 1–8. doi: 10.1371/journal.pgen.1000193.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, R. (1977) ‘DNA sequencing with chain-terminating inhibitors’, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74(12), pp. 5463–5467. doi: 10.1093/annonc/mdp039.
- Sejvar, J. J. *et al.* (2005) ‘Amyotrophic lateral sclerosis mortality in the United States, 1979-2001’, *Neuroepidemiology*, 25(3), pp. 144–152. doi: 10.1159/000086679.
- Sergeant, N. *et al.* (1997) ‘Different distribution of phosphorylated tau protein isoforms in Alzheimer’s and Pick’s diseases’, *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 412(3), pp. 578–582. doi: 10.1016/S0014-5793(97)00859-4.
- Shatunov, A. *et al.* (2010) ‘Chromosome 9p21 in sporadic amyotrophic lateral sclerosis in the UK and seven other countries: A genome-wide association study’, *The Lancet Neurology*, 9(10), pp. 986–994. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70197-6.
- Shibata, N. *et al.* (1996) ‘Intense Superoxide dismutase-1 Immunoreactivity in Intracytoplasmic Hyaline Inclusions of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis with Posterior Column Involvement’, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 55(4), pp. 481–490.
- Shukla, S. A. *et al.* (2015) ‘Comprehensive analysis of cancer-associated somatic mutations in class I HLA genes HHS Public Access Author manuscript’, *Nat Biotechnol*, 33(11), pp. 1152–1158. doi: 10.1038/nbt.3344.
- Siddique, T. *et al.* (1991) ‘Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic-locus heterogeneity’, *The New England Journal of Medicine*, 324(20), pp. 1381–1384. doi: 10.1056/NEJM199103213241201.
- Siddique, T. and Deng, H.-X. (1996) ‘Genetics of amyotrophic lateral sclerosis’, *Revue Neurologique*, 5(1), pp. 1465–1470. doi: 10.1016/j.neurol.2017.03.030.
- Sieben, A. *et al.* (2012) ‘The genetics and neuropathology of frontotemporal lobar degeneration’, *Acta Neuropathologica*, 124(3), pp. 353–372. doi: 10.1007/s00401-012-1029-x.
- Simpson, C. L. *et al.* (2009) ‘Variants of the elongator protein 3 (ELP3) gene are associated with motor neuron degeneration’, *Human Molecular Genetics*, 18(3), pp. 472–481. doi: 10.1093/hmg/ddn375.
- Skibinski, G. *et al.* (2005) ‘Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia.’, *Nature genetics*, 37(8), pp. 806–808.
- Sleegers, K. *et al.* (2008) ‘Progranulin genetic variability contributes to amyotrophic lateral sclerosis’, *Neurology*, 71(4), pp. 253–259. doi: 10.1212/01.wnl.0000289191.54852.75.

- Smith, B. N. *et al.* (2014) 'Exome-wide Rare Variant Analysis Identifies TUBA4A Mutations Associated with Familial ALS', *Neuron*, 84(2), pp. 324–331. doi: 10.1016/j.neuron.2014.09.027.
- Smith, B. N. *et al.* (2017) 'Mutations in the vesicular trafficking protein annexin A11 are associated with amyotrophic lateral sclerosis', *Sci Transl Med.*, 9(388). doi: doi:10.1126/scitranslmed.aad9157.
- Solovieff, N. *et al.* (2013) 'Pleiotropy in complex traits: challenges and strategies', *Nat Rev Genet*, 14(7), pp. 483–495. doi: doi:10.1038/nrg3461.
- Solski, J. A. *et al.* (2012) 'Mutation analysis of the optineurin gene in familial amyotrophic lateral sclerosis', *Neurobiology of Aging*. Elsevier Inc., 33(1), pp. 210.e9-210.e10. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.09.023.
- La Spada, A. R. *et al.* (1991) 'Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy.', *Nature*, 352(6330), pp. 77–79.
- Spillantini, M. G. and Goedert, M. (2013) 'Tau pathology and neurodegeneration', *The Lancet Neurology*. Elsevier Ltd, 12(6), pp. 609–622. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70090-5.
- Sreedharan, J. *et al.* (2008) 'TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis.', *Science (New York, N.Y.)*, 319(5870), pp. 1668–1672. doi: 10.1126/science.1154584.
- Synofzik, M. *et al.* (2012) 'Mutant superoxide dismutase-1 indistinguishable from wild-type causes ALS', *Human Molecular Genetics*, 21(16), pp. 3568–3574. doi: 10.1093/hmg/dd5188.
- Takahashi, Y. *et al.* (2013) 'ErbB4 mutations that disrupt the neuregulin-erbB4 pathway cause amyotrophic lateral sclerosis type 19', *American Journal of Human Genetics*, 93(5), pp. 900–905. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.09.008.
- Talbot, K. (2011) 'Familial versus sporadic amyotrophic lateral sclerosis -A false dichotomy?', *Brain*, 134(12), pp. 3429–3431. doi: 10.1093/brain/awr296.
- Taylor, J. P., Brown, R. H. and Cleveland, D. W. (2016) 'Decoding ALS: from genes to mechanism', *Nature*, 539(7628), pp. 197–206. doi: 10.1038/nature20413.
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T. and Mesirov, J. P. (2013) 'Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration', *Briefings in Bioinformatics*, 14(2), pp. 178–192. doi: 10.1093/bib/bbs017.
- Ticozzi, N. *et al.* (2011) 'Mutational analysis reveals the FUS homolog TAF15 as a candidate gene for familial amyotrophic lateral sclerosis', *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 156(3), pp. 285–290. doi: 10.1002/ajmg.b.31158.
- Tollervey, J. *et al.* (2011) 'Characterising the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43: implications for neurodegenerative diseases', *Nature Neuroscience*, 14(4), pp. 452–458. doi: 10.1038/nn.2778.Characterising.

- Tolnay, M. and Probst, A. (1995) 'Frontal lobe degeneration: novel ubiquitin- immunoreactive neurites within frontotemporal cortex', *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 21(6), pp. 492–497. doi: 10.1111/j.1365-2990.1995.tb01095.x.
- Tolnay, M. and Probst, A. (2002) 'Frontotemporal lobar degeneration - Tau as a pied piper?', *Neurogenetics*. doi: 10.1007/s10048-002-0140-x.
- Traynor, B. J. *et al.* (2000) 'Clinical Features of Amyotrophic Lateral Sclerosis According to the El Escorial and Airlie House Diagnostic Criteria', 57, pp. 1171–1176.
- Turner, M. R. *et al.* (2017) 'Genetic screening in sporadic ALS and FTD', *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 88(12), pp. 1042–1044. doi: 10.1136/jnnp-2017-315995.
- Untergasser, A. *et al.* (2012) 'Primer3-new capabilities and interfaces', *Nucleic Acids Research*, 40(15), pp. 1–12. doi: 10.1093/nar/gks596.
- Vajda, A. *et al.* (2017) 'Genetic testing in ALS: A survey of current practices', *Neurology*, 88(10), pp. 991–999. doi: 10.1212/WNL.0000000000003686.
- Vance, C. *et al.* (2009) 'Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6', *Science*, 323(February), pp. 1208–1211. doi: 10.1126/science.1165942.Mutations.
- Vengoechea, J. *et al.* (2013) 'Clinical variability and female penetrance in X-linked familial FTD/ALS caused by a P506S mutation in UBQLN2.', *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration*, 14(7–8), pp. 615–619. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23944734>.
- Wang, K., Li, M. and Hakonarson, H. (2010) 'ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data', *Nucleic Acids Research*, 38(16), pp. 1–7. doi: 10.1093/nar/gkq603.
- Watts, G. D. J. *et al.* (2004) 'Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein.', *Nature genetics*, 36(4), pp. 377–381. doi: 10.1038/ng1332.
- Wijesekera, L. C. and Leigh, P. N. (2009) 'Amyotrophic lateral sclerosis.', *Orphanet journal of rare diseases*, 4(3). doi: 10.1186/1750-1172-4-3.
- Williams, K. L. *et al.* (2016) 'CCNF mutations in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia', *Nature communications*, 7(11253). doi: 10.1038/ncomms11253 (2016).
- Wojtas, A. *et al.* (2012) 'C9ORF72 repeat expansions and other FTD gene mutations in a clinical AD patient series from Mayo Clinic', *Am J Neurodegener Dis*, 1(1), pp. 107–118. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23383383>.

- Wu, C.-H. *et al.* (2012) 'Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis', *Nature*, pp. 499–503.
- Zakaryan, R. P. and Gehring, H. (2006) 'Identification and Characterization of the Nuclear Localization/Retention Signal in the EWS Proto-oncoprotein', *Journal of Molecular Biology*, 363(1), pp. 27–38. doi: 10.1016/j.jmb.2006.08.018.
- van der Zee, J. *et al.* (2013) 'A Pan-European Study of the C9orf72 Repeat Associated with FTL D: Geographic Prevalence, Genomic Instability, and Intermediate Repeats', *Human Mutation*, 34(2), pp. 363–373. doi: 10.1002/humu.22244.
- van der Zee, J. *et al.* (2017) 'TBK1 Mutation Spectrum in an Extended European Patient Cohort with Frontotemporal Dementia and Amyotrophic Lateral Sclerosis', *Human Mutation*, 38(3), pp. 297–309. doi: 10.1002/humu.23161.
- Van Der Zee, J. *et al.* (2014) 'Rare mutations in SQSTM1 modify susceptibility to frontotemporal lobar degeneration', *Acta Neuropathologica*, 128(3), pp. 397–410. doi: 10.1007/s00401-014-1298-7.
- Zhang, M. *et al.* (2015) 'Mutation analysis of CHCHD10 in different neurodegenerative diseases', *Brain*, 138(9), p. e380. doi: 10.1093/brain/awv082.
- Zhao, Z. H. *et al.* (2009) 'A novel mutation in the senataxin gene identified in a Chinese patient with sporadic amyotrophic lateral sclerosis', *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 10(2), pp. 118–122. doi: 10.1080/17482960802572673.



Anexos

ANEXO I. TABLAS SUPLEMENTARIAS.

Gen	Locus	Proteína	Herencia	%ELAf	%ELAe	Otros	Técnica	Año
<i>C9orf72</i>	9p21.2	Desconocida	AD	15-45	2-20	DFT, EA, ataxia	GWAS, análisis de ligamiento	(Laaksovirta <i>et al.</i> , 2010; Alan E Renton <i>et al.</i> , 2011; DeJesus-Hernandez <i>et al.</i> , 2011)
<i>SOD1</i>	21q22.1	Superóxido dismutasa 1	AD, AR	15-20	2-7	ELA juvenil	Análisis de ligamiento	(Siddique <i>et al.</i> , 1991; Rosen <i>et al.</i> , 1993)
<i>TARDBP</i>	1p36.22	TDP-43	AD	5	1	DFT, EA	Análisis de ligamiento, gen candidato	(Gitcho <i>et al.</i> , 2008; Kabashi <i>et al.</i> , 2008; Sreedharan <i>et al.</i> , 2008)
<i>FUS</i>	16q11.2	Proteína de fusión en sarcoma	AD, AR	3	1	ELA juvenil, DFT	Análisis de ligamiento, gen candidato	(Sreedharan <i>et al.</i> , 2008; Kwiatkowski <i>et al.</i> , 2009; Vance <i>et al.</i> , 2009)
<i>TBKI</i>	12q14.2	TANK-binding kinase 1	AD	3	1	DFT	WES	(Cirulli <i>et al.</i> , 2015)
<i>SQSTM1</i>	5q35.3	p62	AD, factor de riesgo	2	1	DFT, MCI, Enfermedad de Paget	Gen candidato	(Fecto <i>et al.</i> , 2011)
<i>OPTN</i>	10p13	Optineurina	AD, AR	1-2	<1	DFT, POAG, ataxia	Gen candidato: mapeo de homocigosidad	(Maruyama <i>et al.</i> , 2010)
<i>CHMP2B</i>	3p11.2	Proteína B del cuerpo multivesicular cargado	AD	<1	<1	DFT	Análisis de ligamiento, gen candidato	(Parkinson <i>et al.</i> , 2006)
<i>SETX</i>	9q34.13	Senataxina	AD, AR	<1	<1	ELA juvenil, AOA2	Análisis de ligamiento	(Chen <i>et al.</i> , 2004)
<i>VCP</i>	9p13.3	Proteína contenedora de valosina	AD	<1	<1	DFT, MCI, Enfermedad de Paget	Estudio familiar: WES	(Johnson <i>et al.</i> , 2010)
<i>UBQLN2</i>	Xp11.21	Ubiquilina 2	Ligada al X	<1	<1	ELA juvenil, DFT	Análisis de ligamiento	(Deng <i>et al.</i> , 2011)
<i>MATR3</i>	5q31.2	Matrin 3	AD	<1	<1	-	Estudio familiar: WES	(Johnson <i>et al.</i> , 2014)
<i>TUBA4A</i>	2q35	Tubulina alfa-4A	AD	<1	<1	DFT	WES	(Smith <i>et al.</i> , 2014)
<i>NEK1</i>	4q33	Kinasa 1 relacionada con NIMA	AD, factor de riesgo	<1	<1	-	WES	(Brenner <i>et al.</i> , 2016; Kenna <i>et al.</i> , 2016)

ANG	14q11.2	Angiogenina	AD	<1	<1	EP	Gen candidato, estudio de asociación	(Greenway <i>et al.</i> , 2006)
FIG4	6q21	FIG4 phosphoinositide 5-phosphatase	AD, AR	<1	<1	CMT4J , Síndrome Yunis-Varon	Gen candidato	(Chow <i>et al.</i> , 2009)
VAPB	20q13.33	Vesicle-associated membrane protein B	AD	<1	<1	AME	Análisis de ligamiento	(Nishimura <i>et al.</i> , 2004)
DAO	12q24.1	D-aminoácido oxidasa	AD	<1	<1	-	Análisis de ligamiento	(Mitchell <i>et al.</i> , 2010)
ERBB4	2q34	Proteína del corion ErB.4	AD	<1	<1	-	WGS	(Takahashi <i>et al.</i> , 2013)
CCNF	16p13.3	Ciclina F	AD	<1	<1	DFT	GWAS, WES	(Williams <i>et al.</i> , 2016)
ALS2	2q33.1	Alsina	AR	<1	<1	HSP	Análisis de ligamiento	(Hadano <i>et al.</i> , 2001)
SIGMAR1	9p13.3	Receptor Sigma-1	AR	<1	<1	ELA juvenil	Estudio familiar: mapeo de homocigosidad	(Al-Saif, Al-Mohanna and Bohlega, 2011)
PFN1	17p13.2	Profilina 1	AD, factor de riesgo	<1	<1	-	Estudio familiar: WES	(Wu <i>et al.</i> , 2012)
SPG11	15q21.1	Espataxina	AR	<1	<1	ELA juvenil, HSP	Análisis de ligamiento, estudio familiar, gen candidato, WES	(Orlacchio <i>et al.</i> , 2010; Daoud <i>et al.</i> , 2012)
CHCHD10	22q11.2	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 10	AD	<1	<1	DFT, ataxia cerebelar, miopatía	Estudio familiar: WES	(Bannwarth <i>et al.</i> , 2014; Chaussenot <i>et al.</i> , 2014)
DCTN1	2p13.1	Subunidad 1 de dinactina	AD	<1	<1	DFT, Síndrome de Perry	Estudio de ligamiento	(Puls <i>et al.</i> , 2003)
TAF15	17q12	Factor 15 asociado a la proteína de unión a caja TATA	AD, factor de riesgo	-	-	-	Gen candidato	(Couthouis <i>et al.</i> , 2011)
EWSR1	22q12.2	Región 1 de ruptura del sarcoma de Ewing	AD	-	-	-	Gen candidato	(Couthouis <i>et al.</i> , 2012)
HNRNRP A1	12q13.1	Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas A1	AD	-	-	DFT, MCI, Enfermedad de Paget	Estudio familiar, WES	(Kim <i>et al.</i> , 2013)
HNRNPA2B1	7p15.2	Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas A2/B1	AD	-	-	DFT, MCI, Enfermedad de Paget	Estudio familiar, WES	(Kim <i>et al.</i> , 2013)

SPAST	2q24	Espastina	AD, ELA juvenil	-	-	HSP	Gen candidato	(Meyer <i>et al.</i> , 2005)
ANXA11	10q22.3	Anexina 11A	AD, factor de riesgo	-	-	-	WGS	(Smith <i>et al.</i> , 2017)
MAPT	17q21.31	Proteína TAU asociada a microtúbulos	AD	-	-	DFT	Gen candidato, estudio de asociación	(Hutton <i>et al.</i> , 1998)
ATXN2	12q23.3	Ataxina 2	Factor de riesgo, AD	-	-	ER CAG 27-33, SCA2 >34	Gen candidato	(Elden <i>et al.</i> , 2010)
SARM1	17q11.2	Proteína 1 que contiene motivos alfa y TIR estériles	Factor de riesgo	-	-	-	GWAS	(Fogh <i>et al.</i> , 2014; Van Rheenen <i>et al.</i> , 2016)
UNC13A	19p13.12	Proteína UNC-13 homóloga A	Factor de riesgo	-	-	-	GWAS	(Diekstra <i>et al.</i> , 2012)
GLE1	9q33.3	Nucleoporina GLE1	AR	-	-	-	Gen candidato	(Kanab <i>et al.</i> , 2015)
SPG7	16q24.1	Paraplegina	AD, AR	-	-	HSP	Panel génico	(Krüger <i>et al.</i> , 2016)
ELP3	8p21.1	Proteína de elongación homóloga 3	AD	-	-	-	GWAS	(Simpson <i>et al.</i> , 2009)
GRN	21q22.1	Progranulina	AD	-	-	DFT, EA	Análisis de ligamiento	(Slegers <i>et al.</i> , 2008)
KIF5A	12q13.13	Cadena pesada de la kinasa isoforma 5A	AD	-	-	HSP, CMT2	GWAS	(Nicolas <i>et al.</i> , 2018)
SORT1	1p21.3	Sortilina	AD	-	-	-	Gen candidato	(Belzil <i>et al.</i> , 2012)
SMN1 SMN2	5q13.2	Survival motor neuron protein	Factor de riesgo, AD	-	-	AME	Gen candidato, estudio de asociación	(Corcia <i>et al.</i> , 2002)
NEFH	22q12.2	Polipéptido del neurofilamento pesado	AD	-	-	CMT2CC	Gen candidato, estudio de asociación	(Figlewicz <i>et al.</i> , 1994; Al-Chalabi <i>et al.</i> , 1999)
TREM2	6p21.1	Receptor desencadenante expresado en células mieloides 2	AD, AR, Factor de riesgo	-	-	DFT, EA	Gen candidato, WES, estudio de asociación	(Guerreiro <i>et al.</i> , 2013)
AR	Xq12	Receptor de andrógenos	Ligada al X	-	-	ER CAG > 38 AME	Gen candidato	(La Spada <i>et al.</i> , 1991)

Tabla A. Descripción de los genes implicados en la patología de la ELA. “Otros” hace referencia a la implicación de estos genes en otras patologías así como si tienen incidencia en la ELA de inicio juvenil. La columna “Técnica” hace referencia a la estrategia llevada a cabo durante su descubrimiento. En la columna “Herencia”, el color **azul** hace referencia a que ese modo de herencia está implicado en la patología del mismo color. Los que tienen un % sin señalar es debido al pequeño número de casos descritos.

Gen	Locus	Proteína	Herencia	%DFTf	%DFTe	Otros	Técnica	Año
<i>C9orf72</i>	9p21.2	Desconocida	AD	15-45	2-20	ELA, EA, ataxia	GWAS, análisis de ligamiento	(Laaksovirta <i>et al.</i> , 2010; Alan E Renton <i>et al.</i> , 2011; DeJesus-Hernandez <i>et al.</i> , 2011)
<i>GRN</i>	21q22.1	Progranulina	AD	15-20	2-20	ELA, EA	Análisis de ligamiento	(Baker <i>et al.</i> , 2006; Cruts <i>et al.</i> , 2006)
<i>MAPT</i>	17q21.31	Proteína TAU asociada a microtúbulos	AD	10	2-5	ELA	Gen candidato, estudio de asociación	(Hutton <i>et al.</i> , 1998)
<i>TARDBP</i>	1p36.22	TDP-43	AD	5	1	ELA, EA	Análisis de ligamiento, gen candidato	(Gitcho <i>et al.</i> , 2008; Kabashi <i>et al.</i> , 2008; Sreedharan <i>et al.</i> , 2008)
<i>TBKI</i>	12q14.2	TANK-binding kinase 1	AD	3	1	ELA	WES	(Cirulli <i>et al.</i> , 2015)
<i>FUS</i>	16q11.2	Proteína de fusión en sarcoma	AD, AR	3	1	ELA, ELA juvenil	Análisis de ligamiento, gen candidato	(Sreedharan <i>et al.</i> , 2008; Kwiatkowski <i>et al.</i> , 2009; Vance <i>et al.</i> , 2009)
<i>SQSTM1</i>	5q35.3	p62	AD, factor de riesgo	2	1	ELA, MCI, Enfermedad de Paget	Gen candidato	(Fecto <i>et al.</i> , 2011)
<i>VCP</i>	9p13.3	Proteína contenedora de valosina	AD	<1	<1	ELA, MCI, Enfermedad de Paget	Estudio familiar: WES	(Johnson <i>et al.</i> , 2010)
<i>PSEN1</i>	14q24.2	Presenilina 1	AD	<1	<1	EA, Enfermedad de Pick	Gen candidato	(Mendez and Mcmurtray, 2006; Raux <i>et al.</i> , 2012)
<i>PSEN2</i>	1q42.13	Presenilina 2	AD	<1	<1	EA, Enfermedad de Pick	Gen candidato	(Mendez and Mcmurtray, 2006; Gallo <i>et al.</i> , 2010)
<i>DCTN1</i>	2p13.1	Subunidad 1 de dinactina	AD	<1	<1	ELA, Síndrome de Perry	Estudio de ligamiento	(Puls <i>et al.</i> , 2003)
<i>OPTN</i>	10p13	Optineurina	AD, AR	<1	<1	ELA, POAG, ataxia	Gen candidato: mapeo de homocigosidad	(Maruyama <i>et al.</i> , 2010)
<i>UBQLN2</i>	Xp11.21	Ubiquilina 2	Ligada al X	<1	<1	ELA juvenil, DFT	Análisis de ligamiento	(Deng <i>et al.</i> , 2011)
<i>CHMP2B</i>	3p11.2	Proteína B del cuerpo multivesicular cargado	AD	<1	<1	ELA	Análisis de ligamiento, gen candidato	(Parkinson <i>et al.</i> , 2006)

CHCHD10	22q11.2	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 10	AD	-	-	ELA, ataxia cerebelar, miopatía	Estudio familiar: WES	(Bannwarth <i>et al.</i> , 2014; Chaussenot <i>et al.</i> , 2014)
TUBA4A	2q35	Tubulina alfa-4A	AD	<1	<1	ELA	WES	(Smith <i>et al.</i> , 2014)
CCNF	16p13.3	Ciclina F	AD	-	-	ELA	WES	(Williams <i>et al.</i> , 2016)
HNRNRP1	12q13.1	Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas A1	AD	-	-	ELA, MCI, Enfermedad de Paget	Estudio familiar, WES	(Kim <i>et al.</i> , 2013)
HNRNPA2B1	7p15.2	Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas A2/B1	AD	-	-	ELA, MCI, Enfermedad de Paget	Estudio familiar, WES	(Kim <i>et al.</i> , 2013)
TMEM106B	7p21.3	Proteína transmembrana 106B	Factor de riesgo	-	-	EA	GWAS	(Van Blitterswijk <i>et al.</i> , 2014)
TREM2	6p21.1	Receptor desencadenante expresado en células mieloides 2	AD, AR, Factor de riesgo	-	-	ELA, EA	Gen candidato, estudio de asociación	(Borroni <i>et al.</i> , 2014; Le Ber <i>et al.</i> , 2014)

Tabla B. Descripción de los genes implicados en la patología de la ELA. “Otros” hace referencia a la implicación de estos genes en otras patologías así como si tienen incidencia en la ELA de inicio juvenil. La columna “Técnica” hace referencia a la estrategia llevada a cabo durante su descubrimiento. En la columna “Herencia”, el color *azul* o *morado*, hace referencia al modo de herencia implicado en la patología del mismo color. Los que tienen un % sin señalar es debido al pequeño número de casos descritos.

Gen	dbSNP	ADNc	Cambio de aa	ELAE	ELAf	DFTe	DFTf	ELA-DFT	GnomAD NFE_MAF exome
Expansiones									
<i>ATXN2</i>	rs193922927	c.532_534CAG	(CAG)n, n ≥ 30	0/70	4/50	0/35	0/5	2/34	6,37x10 ⁻³
<i>C9orf72</i>	-	-	(GGGGCC)n, n > 30	18/911	24/126	1/115	1/37	12/120	1,44x10 ⁻³
Categoría 1									
<i>SOD1</i>	-	c.10A>G	p.K3E ^C	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	0
<i>SOD1</i>	-	c.65A>G	p.E21G ^C	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>SOD1</i>	rs1169198442	c.68A>T	p.Q22L ^C	1/921	2/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>SOD1</i>	-	c.112G>C	p.G37R ^C	0/921	7/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>SOD1</i>	-	c.197A>G	p.N65S ^C	2/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>SOD1</i>	-	c.255G>T	p.L84F ^C	0/921	2/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>SOD1</i>	-	c.280G>A	p.G93S ^C	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>SOD1</i>	rs121912440	c.319C>G	p.L106V ^C	0/921	2/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>SOD1</i>	rs74315452	c.338T>C	p.I112T ^C	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>SOD1</i>	rs199474723	c.352C>G	p.L117V ^C	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>SOD1</i>	rs1457889952	c.358G>C	p.V119L ^C	2/921	0/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>SOD1</i>	-	c.418A>C	p.N139H ^C	1/921	2/143	0/115	0/37	1/120	0
<i>SOD1</i>	-	c.435G>T	p.L144F ^C	1/921	0/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>SOD1</i>	rs121912449	c.455T>C	p.I151T ^C	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>TARDBP</i>	-	c.893G>C	p.G298A	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	0
<i>TARDBP</i>	rs80356734	c.1055A>G	p.N352S	1/921	2/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>TARDBP</i>	rs80356743	c.1178C>T	p.S393L	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>TBK1</i>	-	c.762_763delTG	p.N254fsX4	0/921	0/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>TBK1</i>	-	c.1717C>G	p.R573G	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	0
<i>TUBA4A</i>	rs730880028	c.643C>T	p.R215C	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	0
<i>CCNF</i>	rs1371569927	c.585T>G	p.S195R	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>B4GALNT1</i>	rs879255241	c.358C>T	p.Q120X	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
Categoría 2									
<i>SOD1</i>	rs768029813	c.59A>G	p.N19S ^C	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	1,77x10 ⁻⁴
<i>SOD1</i>	rs80265967	c.272A>C	p.D90A ^C	0/921	2 ^{HOMO} /143	0/115	1/37	0/120	7,29x10 ⁻⁴
<i>SOD1</i>	rs121912441	c.341T>C	p.I113T ^C	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	1,05x10 ⁻⁴
<i>SOD1</i>	rs143100660	c.423T>A	p.A140= ^C	1/921	0/143	0/115	0/37	0/120	5,63x10 ⁻⁴
<i>SOD1</i>	rs1424014997	c.449T>C	p.I149T ^C	0/921	2/143	0/115	0/37	0/120	1,76x10 ⁻⁵
<i>TARDBP</i>	rs80356721	c.881G>T	p.G294V	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	2,64x10 ⁻⁵

<i>TARDBP</i>	rs80356723	c.883G>A	p.G295S	1 ^E /921	1/143	0/115	0/37	2/120	1,76x10 ⁻⁵
<i>TARDBP</i>	rs80356740	c.1147A>G	p.I383V	0/921	0/143	0/115	1/37	0/120	1,89x10 ⁻⁵
<i>FUS</i>	rs886041390	c.1574C>T	p.P525L	3/921	0/143	0/115	0/37	0/120	8,79x10 ⁻⁶
<i>GRN</i>	rs25647	c.1544G>C	p.G515A	0/921	0/143	1/115	0/37	0/120	2,9x10 ⁻⁴
<i>GRN</i>	rs141111290	c.1555G>A	p.V519M	0/921	0/143	1/115	0/37	0/120	6,15x10 ⁻⁵
<i>SQSTM1</i>	rs200396166	c.98C>T	p.A33V	0/921	2/143	0/115	0/37	0/120	1,15x10 ⁻³
<i>SQSTM1</i>	rs1478180381	c.625C>T	p.R209C	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	8,84x10 ⁻⁶
<i>SQSTM1</i>	rs11548633	c.712A>G	p.K238E	1/921	0/143	0/115	2/37	0/120	3,63x10 ⁻³
<i>SQSTM1</i>	rs140226523	c.961C>T	p.R321C	1/921	0/143	1/115	0/37	1/120	6,5x10 ⁻⁴
<i>SQSTM1</i>	rs104893941	c.1175C>T	p.P392L	0/921	1 ^B /143	0/115	0/37	1/120	1,45x10 ⁻³
<i>TBK1</i>	rs748007618	c.236_238delCAA	p.T79del	1/921	0/143	0/115	0/37	0/120	9,59x10 ⁻⁶
<i>TBK1</i>	rs755655622	c.1057A>G	p.I353V	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	2,64x10 ⁻⁵
<i>ANXA11</i>	rs1247392012	c.119A>G	p.D90G	1/921	0/143	0/115	0/37	0/120	3,4x10 ⁻⁵
<i>ANG</i>	rs535311762	c.368G>C	p.G123A	1/921	0/143	0/115	0/37	0/120	5,27x10 ⁻⁵
<i>FIG4</i>	rs121908287	c.122T>C	p.I41T	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	1,87x10 ⁻³
<i>MAPT</i>	rs143956882	c.1280C>T	p.S427F	0/921	0/143	1/115	1/37	2/120	2,14x10 ⁻³
<i>MAPT</i>	rs143624519	c.1405G>A	p.A469T ^D	0/921	1/143	1/115	0/37	0/120	2,29x10 ⁻³
<i>PSEN1</i>	rs200888596	c.1093T>G	p.S365A	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	1,76x10 ⁻⁵
<i>SPG7</i>	rs121918358	c.233T>A	p.L78X	1/921	0/143	0/115	0/37	0/120	1,23x10 ⁻⁴
<i>SPG7</i>	rs61755320	c.1529C>T	p.A510V	2/921	2/143	0/115	1/37	0/120	4,95x10 ⁻³
<i>CHCHD10</i>	rs551521196	c.100C>T	p.P34S	1/921	0/143	1/115	0/37	1/120	5,01x10 ⁻³
<i>CHCHD10</i>	rs775332895	c.239C>T	p.P80L	0/921	0/143	0/115	1/37	0/120	2,28x10 ⁻⁴
<i>TREM2</i>	rs75932628	c.140G>A	p.R47H	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	2,52x10 ⁻³
<i>TREM2</i>	rs143332484	c.185G>A	p.R62H	0/921	0/143	0/115	2/37	0/120	1,12x10 ⁻²
<i>CHMP2B</i>	rs374277596	c.248C>T	p.T83I	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	1,76x10 ⁻⁵
<i>PRPH</i>	rs58599399	c.421G>T	p.D141Y	1/921	0/143	0/115	0/37	0/120	5,95x10 ⁻³
Categoría 3									
<i>SOD1</i>	-	c.16G>A	p.V5M ^C	1/921	0/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>SOD1</i>	-	c.123A>T	p.E40D ^C	1/921	0/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>SOD1</i>	-	c.314_319delTCTCAC	p.Del(L106,S107) ^C	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>SOD1</i>	-	c.379_380insC	p.L126fsX7 ^C	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>SOD1</i>	-	c.431G>C	p.R143P ^C	1/921	0/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>TBK1</i>	-	c.762_763delTG	p.N254fsX4	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	0
<i>TBK1</i>	-	c.1652_1653delAA	p.K551fsX23	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	0
<i>FUS</i>	-	c.377A>G	p.Q126R	0/921	1/143	0/115	0/37	-	0
<i>FUS</i>	-	c.665_666insCGG	p.G231dup	1/921	0/143	0/115	0/37	0/120	0

<i>GRN</i>	-	c.482G>T	p.R161M	0/921	0/143	1/115	1/37	0/120	0
<i>MAPT</i>	-	c.428C>G	p.P143R	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	0
<i>VCP</i>	rs773912640 ^F	c.2231G>A	p.R744H	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>ANG</i>	-	c.190A>T	p.K64X	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>ANXA11</i>	-	c.1191G>T	p.E397D	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>ARPP21</i>	-	c.1686C>A	p.P563Q	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>ATXN2</i>	rs193922933	c.709G>A	p.G237S	0/921	0/143	0/115	1/37	0/120	0
<i>C12orf65</i>	rs1380513950	c.205_218del	p.G69fsX20	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>C21orf2</i>	-	c.769G>A	p.E257K	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	0
<i>CCNF</i>	rs1197241031	c.1339T>G	p.Y447D	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>CCNF</i>	-	c.1724A>G	p.E575G	1/921	0/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>CHCHD10</i>	-	c.377G>A	p.S126N	0/921	0/143	1/115	0/37	0/120	0
<i>CHGB</i>	-	c.255G>C	p.L85F	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	0
<i>CHGB</i>	-	c.1691C>T	p.P564L	1/921	0/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>ELP3</i>	-	c.37G>T	p.E13X	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	0
<i>ERBB4</i>	rs200112693 ^G	c.1662G>C	p.E554D	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>FIG4</i>	-	c.20C>G	p.P7R	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	0
<i>FIG4</i>	rs543462663 ^G	c.590G>A	p.R197H	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	0
<i>KIF5A</i>	-	c.3013delG	p.D1005fsX43	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>MATR3</i>	rs1281544722 ^G	c.920G>A	p.S307N	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>NEK1</i>	-	c.2304_2305insA	p.H769fsX2	1/921	0/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>NEK1</i>	-	c.2924C>A	p.S975Y	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	0
<i>PSEN1</i>	-	c.178delC	p.R60fsX14	0/921	0/143	1/115	0/37	0/120	0
<i>PSEN1</i>	-	c.874A>G	p.M292V	0/921	0/143	0/115	1/37	0/120	0
<i>SETX</i>	-	c.1793A>G	p.K598R	1/921	0/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>SETX</i>	-	c.1561_1562delCT	p.L521fsX8	0/921	0/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>SIGMAR1</i>	-	c.179G>T	p.R60L	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>SIGMAR1</i>	rs1288299712	c.493G>T	p.G165W	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>SPG11</i>	-	c.4921A>T	p.K1641X	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>SPG11</i>	-	c.6104C>A	p.A2035D	1 ^{HOMO} /921	0/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>SPG7</i>	rs199789849 ^G	c.1048C>T	p.P350S	1/921	0/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>STX12</i>	-	c.633delC	p.Q212fsX4	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	0
<i>TAF15</i>	rs780439108 ^G	c.1168T>A	p.S390T	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	0
<i>TMEM106B</i>	-	c.742T>A	p.Y248N	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	0
<i>TUBA4A</i>	-	c.3+2T>G	sitio de <i>splicing</i>	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	0
<i>TUBA4A</i>	-	c.284G>A	p.G95E	0/921	0/143	1/115	0/37	0/120	0

Categoría 4									
<i>ANXA11</i>	rs773632187	c.484G>A	p.G162R	1/921	0/143	0/115	0/37	0/120	7,18x10 ⁻⁵
<i>CCNF</i>	rs139143672	c.844A>G	p.I282V	0/921	0/143	0/115	1/37	0/120	1,76x10 ⁻⁵
<i>CHGB</i>	rs891947037	c.397C>T	p.R133X	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	8,97x10 ⁻⁶
<i>DAO</i>	rs4262766	c.992G>A	p.G331E	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	1,23x10 ⁻⁴
<i>DCTN1</i>	rs746429168	c.487G>T	p.A163S	0/921	0/143	1/115	0/37	0/120	9,64x10 ⁻⁶
<i>DCTN1</i>	rs369086889	c.1490G>A	p.R497H	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	8,81x10 ⁻⁶
<i>DCTN1</i>	rs1386549364	c.1976C>T	p.S659L	0/921	0/143	0/115	1/37	0/120	8,8x10 ⁻⁶
<i>EPB41L1</i>	rs375772370	c.1600C>T	p.R534W	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	8,81x10 ⁻⁶
<i>ERBB4</i>	rs763212392	c.1997T>C	p.I666T	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	1,76x10 ⁻⁵
<i>FIG4</i>	rs763532414	c.266C>T	p.A89V	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	4,39x10 ⁻⁵
<i>FLNC</i>	rs776362922	c.905C>T	p.T302M	0/921	0/143	0/115	1/37	0/120	5,52x10 ⁻⁵
<i>FLNC</i>	rs371398126	c.2404G>A	p.G802S	0/921	0/143	1/115	0/37	0/120	4,44x10 ⁻⁵
<i>FUS</i>	rs778725612	c.673_681dupGGTGGTGGT	p.G225_G227dup	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	1,7x10 ⁻⁴
<i>KIF5A</i>	rs778095192	c.1268G>A	p.R423H	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	1,77x10 ⁻⁵
<i>MME</i>	rs200164975	c.514G>C	p.E172Q	1/921	0/143	0/115	0/37	0/120	7,08x10 ⁻⁵
<i>NEK1</i>	rs371562840	c.1942A>G	p.K648E	1/921	0/143	0/115	0/37	0/120	1,97x10 ⁻⁴
<i>SETX</i>	rs756600708	c.64G>A	p.A22T	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	2,02x10 ⁻⁴
<i>SETX</i>	rs774068411	c.667C>G	p.L223V	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	7,03x10 ⁻⁵
<i>TBK1</i>	rs748061846	c.125A>G	p.N42S	0/921	1/143	0/115	0/37	0/120	6,56x10 ⁻⁵
<i>TBK1</i>	rs1402092579	c.1921_1923del	p.E643del	0/921	0/143	0/115	0/37	1/120	1,82x10 ⁻⁵

Tabla C. Agrupamiento de todas las variantes halladas en este trabajo.

^B sujeto asintomático en edad pre-sintomática (38 años) con una historia familiar muy completa (no se tendrá en cuenta para los porcentajes); ^C utilización de la nomenclatura clásica en *SOD1* (donde el ATG iniciador no se contabiliza); ^D la variante en *MAPT* p.A469T también es conocida como p.A152T en htau40; ^E paciente con homocigosis para la variante en *TARDBP* p.G295S; ^F variante encontrada en una persona del este asiático, ^G estas variantes se han encontrado únicamente en sujetos latinos (de 1 a 7 sujetos); ^{HOMO} pacientes con homocigosis para la variante en *SPG11* p.A2035D y p.D90A en *SOD1*, respectivamente.

	ELAe	ELAf	DFTe	DFTf	ELA-DFT
Nº de pacientes	921	143	115	37	120
<i>ANG</i>	1	1	-	-	-
<i>ANXA11</i>	2	1	-	-	-
<i>ARPP21</i>	-	1	-	-	-
<i>ATXN2</i>	-	4	-	1	2
<i>B4GALNT1</i>	-	1	-	-	-
<i>C12orf65</i>	-	1	-	-	-
<i>C21orf2</i>	-	-	-	-	1
<i>C9orf72</i>	18	24	1	1	14
<i>CCNF</i>	1	2	-	1	-
<i>CHCHD10</i>	1	-	3	1	1
<i>CHGB</i>	1	-	-	-	2
<i>CHMP2B</i>	-	-	-	-	1
<i>DAO</i>	-	-	-	-	1
<i>DCTN1</i>	-	1	1	1	-
<i>ELP3</i>	-	-	-	-	1
<i>EPB41L1</i>	-	-	-	-	1
<i>ERBB4</i>	-	1	-	-	1
<i>FIG4</i>	-	2	-	-	2
<i>FLNC</i>	-	-	1	1	-
<i>FUS</i>	4	2	-	-	-
<i>GRN</i>	-	-	3	1	-
<i>KIF5A</i>	-	2	-	-	-
<i>MAPT</i>	-	1	1	3	2
<i>MATR3</i>	-	1	-	-	-
<i>MME</i>	1	-	-	-	-
<i>NEK1</i>	2	-	-	-	1
<i>PRPH</i>	1	-	-	-	-
<i>PSEN1</i>	-	1	1	1	-
<i>SETX</i>	1	-	-	-	2
<i>SIGMAR1</i>	-	2	-	-	-
<i>SOD1</i>	11	29	-	1	2
<i>SPG11</i>	1	1	-	-	-
<i>SPG7</i>	4	2	-	1	-
<i>SQSTM1</i>	2	3	1	2	3
<i>STX12</i>	-	1	-	-	-
<i>TAF15</i>	-	-	-	-	1
<i>TARDBP</i>	2	5	-	1	3
<i>TBK1</i>	1	2	-	-	4
<i>TMEM106B</i>	-	-	-	-	1
<i>TREM2</i>	-	-	-	2	1
<i>TUBA4A</i>	-	-	1	-	2
<i>VCP</i>	-	1	-	-	-
Nº total de variantes	54	91	13	18	49
Pacientes con al menos una variante	52	80	12	16	43
% de pacientes con variante	5,65%	56,0%	10,4%	43,3%	35,8%

Tabla D. Clasificación estricta de ELAe, ELAf, DFTe, DFTf.

En el grupo ELA no se compatibiliza la DFT como historia familiar positiva y viceversa. Además, el grupo ELA-DFT únicamente representa a los pacientes que presentan comorbilidad de ambas, sin tener en cuenta posibles antecedentes, es decir, no se tienen en cuenta pacientes de ELA con HFP en DFT y viceversa. De esta manera se evita duplicaciones. // ELAe = ELA esporádica; ELAf = ELA familiar; DFTe = DFT esporádica; DFTf = DFT familiar; ELA-DFT = pacientes con comorbilidad de ambas patologías.

ANEXO II. CONSENTIMIENTO INFORMADO.



Hoja de información para DIAGNÓSTICO MOLECULAR e investigación de esclerosis lateral amiotrófica (ELA), demencia frontotemporal (DFT) y otras patologías neuromusculares

Mediante esta hoja de información, y el consentimiento adjunto, colaboramos junto con el **Laboratorio de Investigación en ELA** de la **Unidad de ELA del Hospital 12 de Octubre** con la finalidad no sólo de poder diagnosticar y conocer la posible causa de la enfermedad en su caso, sino también de aumentar el conocimiento sobre de la misma y así, finalmente, poder fomentar el desarrollo de terapias que ralenticen, estabilicen o eliminen los síntomas de su patología.

HOSPITAL:

Servicio:

Médico responsable:

Investigador Principal: Dr. ALBERTO GARCÍA REDONDO (Unidad ELA – Hospital 12 de Octubre)

Proporciona este consentimiento:

DIAGNÓSTICO:

Procedimiento diagnóstico propuesto:

- ☐ Estudio Genético Molecular
- ☐ Investigación

ESTUDIO GENÉTICO DE

OBJETIVOS Y FINALIDAD DEL ESTUDIO

Las enfermedades neurodegenerativas y entre ellas las **enfermedades de neurona motora y las demencias**, son un problema sanitario de primera magnitud en nuestra sociedad, siendo la ELA la 4ª enfermedad neurodegenerativa de nuestro país y la DLFT el 2º tipo de demencia por debajo de la séptima década de la vida.

En ambos casos, no existe una terapia efectiva y son patologías con una progresión y un final muy complejos, que implican la intervención de un equipo multidisciplinar y que dan lugar a cambios determinantes en el entorno familiar y social del paciente. La búsqueda de las causas genéticas de estas enfermedades han supuesto y siguen siendo a día de hoy la principal fuente de información acerca de cómo se producen estas enfermedades (sus únicas causas demostradas) y de cómo se puede modificar su curso, siendo la única forma de generar dianas terapéuticas que nos dirijan hacia la solución y erradicación tanto de la ELA como de la DFT.

Unidad de ELA. Centro de Actividades Asistenciales - 5ª PI / Bq C. Hospital Universitario 12 de Octubre.
Avda. de Córdoba s/n. 28041 Madrid / Tlf.: 91 779 2784 - mito@h12o.es

COPIA PARA EL PACIENTE

CONSENTIMIENTO

Proporciona la información y este consentimiento:

Yo, D./D^a con DNI

como (marcar lo que proceda):

☐ PACIENTE/PARTICIPANTE

☐ REPRESENTANTE LEGAL: de

☐ TESTIGO DEL CONSENTIMIENTO ORAL de

Declaro bajo mi responsabilidad que:

- He/ha recibido una copia de la Hoja de Información al Participante y una copia firmada de este Consentimiento Informado.
- He/ha leído la Hoja de Información que se me/le ha entregado sobre el estudio.
- He/ha podido hacer preguntas sobre el estudio, he/ha recibido suficiente información sobre el estudio y la he/ha comprendido.
- Comprendo/e que la participación es voluntaria.
- He/ha tenido tiempo para reflexionar sobre mi/su decisión antes de dar el consentimiento.
- Comprendo/e que puedo/e retirarme/se del estudio:
 - 1) Cuando quiera.
 - 2) Sin tener que dar explicaciones.
 - 3) Sin que esto repercuta en mis/sus cuidados médicos.

Presto/a libremente mi/su conformidad para que (Marque con una X la parte del estudio a la que dé consentimiento):

Punto 1

- ☐ se pueda realizar el análisis diagnóstico en relación con en mi/su muestra de ADN.
- ☐ SI / ☐ NO deseo/a ser informado/a de los resultados de dicho estudio.

Punto 2

- ☐ se guarde mi/su muestra de ADN, durante al menos 20 años, permitiendo la realización de investigación en el futuro cuando se tengan más conocimientos sobre los genes relacionados con esta patología.
- En caso de obtenerse de esta investigación resultados individuales y relevantes para mi salud, SI ☐ / NO ☐ deseo/a ser informado/a de los mismos.

Punto 3

- ☐ mis/sus datos clínicos, sin identificación personal, sean introducidos en las bases de datos de acceso restringido para los investigadores y colaboradores.

Firma del paciente

Representante legal o tutor

Testigo del consentimiento oral

Nombre y Apellidos

Firma del médico responsable

Nombre y Apellidos

Nº Colegiado

Fecha

Fecha

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, D./D^a con DNI

como (marcar lo que proceda):

- ☐ PACIENTE/PARTICIPANTE
- ☐ REPRESENTANTE LEGAL:.....de.....
- ☐ TESTIGO DEL CONSENTIMIENTO ORAL de.....

Revoco/a libremente el consentimiento informado firmado en el presente documento para:

Punto 1

- ☐ realizarse el análisis diagnóstico en relación conen mi/su muestra de ADN.
- ☐ ser informado/a del resultado del diagnóstico genético.

Punto 2

- ☐ se guarde mi/su muestra de ADN, durante al menos 20 años, permitiendo la realización de investigación en el futuro cuando se tengan más conocimientos sobre los genes relacionados con.....
- En caso de obtenerse de esta investigación resultados individuales y relevantes para mi salud, SI ☐ / NO ☐ deseo/a ser informado/a de los mismos.

Punto 3

- ☐ mis/sus datos clínicos, sin identificación personal, sean introducidos en las bases de datos europeas de acceso restringido para los investigadores y colaboradores.

Por ello deseo que mis muestras:

- ☐ sean anonimizadas, por lo tanto no podrán localizarse ni ser destruidas.
- ☐ sean destruidas.

Firma del paciente
Representante legal o tutor
Testigo del consentimiento oral
Nombre y Apellidos

Firma del médico responsable
Nombre y Apellidos
Nº Colegiado

Fecha

Fecha

ANEXO III. ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE EL DESARROLLO DEL PRESENTE TRABAJO.

Analysis of known amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia genes reveals a substantial genetic burden in patients manifesting both diseases not carrying the C9orf72 expansion mutation. Dols-Icardo, O., García-Redondo, A., Rojas-García, R., **Borrego-Hernández, D.**, Illán-Gala, I., Muñoz-Blanco, J.L., Rábano, A., Cervera-Carles, L., Juárez-Rufián, A., Spataro, N., De Luna, N., Galán, L., Cortes-Vicente, E., Fortea, J., Blesa, R., Grau-Rivera, O., Lleó, A., Esteban-Pérez, J., Gelpi, E., Clarimón J. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018 Feb;89(2):162-168. doi: 10.1136/jnnp-2017-316820. Epub 2017 Sep 9.

Familial primary lateral sclerosis or dementia associated with Arg573Gly TBK1 mutation. Gómez-Tortosa, E., Van der Zee, J., Ruggiero, M., Gijssels, I., Esteban-Pérez, J., García-Redondo, A., **Borrego-Hernández, D.**, Navarro, E., Sáinz, MJ., Pérez-Pérez, J., Cruys, M., Van Broeckhoven, C., Guerrero-López, R., EU EOD Consortium. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017 Nov;88(11):996-997. doi: 10.1136/jnnp-2016-315250. Epub 2017 Apr 1.

TARDBP mutation associated with semantic variant primary progressive aphasia, case report and review of the literature. González-Sánchez, M.; Puertas-Martín, V.; Esteban-Pérez, J.; García-Redondo, A.; **Borrego-Hernández, D.**; A. Méndez-Guerrero, Llamas-Velasco, S.; Herrero-San Martín, A.; Cordero-Vázquez, P.; Herrero-Manso, M.C.; Pérez-Martínez, D.A. & Villarejo-Galende, A. *Neurocase*, (2019): DOI: 10.1080/13554794.2019.1581225